

**Genomweite Assoziationsstudien zur Identifizierung
Resistenz-vermittelnder Mutationen in *Staphylococcus aureus* – Chancen und
Limitationen eines leistungsfähigen Tools**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Erich Robert Weber
aus Braunschweig

1. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn

2. Referent: apl. Professor Dr. Guido Werner

eingereicht am: 19.11.2018

mündliche Prüfung (Disputation) am: 04.04.2019

Druckjahr 2019

Vorveröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Weber RE, Layer F, Fuchs S, Bender JK, Werner G, Strommenger B. Genome-wide association studies: demonstrating the chances and limitations of a powerful tool. Manuskript in Vorbereitung zur Einreichung bei mBio/Frontiers in Microbiology/ BMC Genomics.

Weber RE, Layer F, Klare I, Werner G, Strommenger B. Comparative evaluation of VITEK® 2 and three commercial gradient strip assays for daptomycin susceptibility testing of *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2017 Nov 1; 72(11):3059-3062.

Weber RE, Layer F, Fuchs S, Bender JK, Fiedler S, Werner G, Strommenger B. Complete genome sequences of two methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolates representing a population subset highly prevalent in human colonization. Genome Announcement. 2016 Jul 28;4(4).

Posterbeiträge

Weber RE, Layer F, Fuchs S, Bender JK, Werner G, Strommenger B. Genome-wide association studies: demonstrating the chances and limitations of a powerful tool – an example. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madrid (2018).

Weber RE, Layer F, Fuchs S, Bender JK, Werner G, Strommenger B. Genome-wide association studies: demonstrating the chances and limitations of a powerful tool – an example. 7th European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics, Göttingen (2017).

Weber RE, Layer F, Fuchs S, Bender JK, Werner G, Strommenger B. Genome-wide association studies for the detection of sequence polymorphisms associated with daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Microbiology and Infection, 5th Joint Conference of the DGHM & VAAM, Würzburg (2017). **Dieses Poster wurde mit einem DGHM-Posterpreis ausgezeichnet.**

Weber RE, Layer F, Fuchs S, Bender JK, Werner G, Strommenger B. Genome-wide association studies for the detection of sequence polymorphisms associated with daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. 17th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (2016), Seoul (2016).

Weber RE, Layer F, Fuchs S, Bender JK, Werner G, Strommenger B. Genome-wide association studies for predicting complex antibiotic resistance from NGS data. 3rd International Conference Pathophysiology of Staphylococci, Tübingen (2016).

Weber RE, Layer F, Fuchs S, Bender JK, Werner G, Strommenger B. Genome-wide association studies for predicting complex antibiotic resistance from NGS data. Robert Koch Symposium "Functional Molecular Infection Epidemiology", Berlin (2016).

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichung der Dissertation	1
Inhaltsverzeichnis.....	3
Zusammenfassung.....	7
Summary	9
1 Einleitung	11
1.1 Staphylococcus aureus.....	11
1.1.1 Staphylococcus aureus als Humanpathogen	11
1.1.2 Besondere Bedeutung von MRSA.....	12
1.1.2.1 HA-MRSA	12
1.1.2.1.1 Bedeutung von HA-MRSA.....	12
1.1.2.1.2 Verbreitung von HA-MRSA.....	13
1.1.2.2 CA-MRSA.....	15
1.1.2.2.1 Bedeutung von CA-MRSA	15
1.1.2.2.2 Verbreitung von CA-MRSA	16
1.1.2.3 LA-MRSA	16
1.1.2.3.1 Bedeutung von LA-MRSA	16
1.1.2.3.2 Verbreitung von LA-MRSA.....	16
1.1.2.4 Detektion von MRSA	17
1.2 Antibiotikaresistenzen in Bakterien.....	18
1.2.1 Antibiotika	18
1.2.2 Grundlage der Antibiotikaresistenz in Bakterien.....	18
1.2.3 Antibiotikaresistenzen in Bakterien mit dem Fokus auf <i>S. aureus</i>.....	18
1.2.3.1 β -Laktamresistenz in <i>S. aureus</i>	20
1.2.3.2 Ceftarolin-Resistenz in <i>S. aureus</i>	21
1.2.3.3 Daptomycin-Resistenz in <i>S. aureus</i>	23
1.3 Ganzgenomsequenzierung in der klinischen Mikrobiologie	27
1.4 Genomweite Assoziationsstudien	29
1.4.1 Entstehung genomweiter Assoziationsstudien.....	29
1.4.2 Funktionsweise bakterieller GWAS.....	30
1.4.3 Störfaktoren bakterieller GWAS.....	31
1.5 Zielsetzung	35
2 Material und Methoden.....	37
2.1 Material	37

2.1.1	Verwendete Geräte	37
2.1.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien	38
2.1.3	Verwendete Chemikalien.....	39
2.1.4	Verwendete Antibiotika	39
2.1.5	Verwendete Epsilometer Teststreifen	40
2.1.6	Verwendete Nährmedien	40
2.1.7	Verwendete Lösungen.....	41
2.1.8	Verwendete Enzyme.....	42
2.1.9	Verwendete Plasmide.....	42
2.1.10	Verwendete Primer	44
2.1.11	Verwendete Software.....	46
2.1.12	Bakterielle Isolate	48
2.1.12.1	Bakterielle Isolate für die Evaluierung kommerzieller Testsystemen zur Bestimmung der DAP Empfindlichkeit.....	48
2.1.12.2	Bakterielle Isolate für die Identifizierung DAP-R assoziierter SNPs.....	48
2.1.12.3	Bakterielle Isolate für die Identifizierung CPT-R assoziierter SNPs	48
2.1.12.4	Bakterielle Isolate für die Etablierung von <i>S. aureus</i> Substitutionsmutanten.....	50
2.2	Methoden	51
2.2.1	Kultivierung und Archivierung von <i>S. aureus</i>	51
2.2.1.1	Kultivierung.....	51
2.2.1.2	Kryokonservierung.....	51
2.2.2	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	51
2.2.2.1	Mikrobouillon Dilutionsverfahren	51
2.2.2.2	Epsilometer Test.....	52
2.2.2.3	VITEK.....	52
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	52
2.2.3.1	Allgemeine Methoden	52
2.2.3.1.1	Agarosegelelektrophorese	52
2.2.3.1.2	Polymerase Kettenreaktion.....	53
2.2.3.2	Methoden zur DNA Präparation.....	54
2.2.3.2.1	Isolation genomischer DNA.....	54
2.2.3.2.2	Isolation plasmidaler DNA	54
2.2.3.3	Methoden zur Sequenzierung.....	54
2.2.3.3.1	Sanger-Sequenzierung.....	54
2.2.3.3.2	Illumina Ganzgenomsequenzierung	55

2.2.3.3.3	Bibliotheken-Generierung für die MiSeq Ganzgenomsequenzierung	56
2.2.3.3.4	MiSeq Ganzgenomsequenzierung und Qualitätskontrolle	56
2.2.3.4	Methoden zur Mutagenese von <i>S. aureus</i>	56
2.2.3.4.1	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i>	57
2.2.3.4.2	Herstellung elektrokompeter <i>S. aureus</i>	58
2.2.3.4.3	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i>	58
2.2.3.4.4	Transformation von Plasmiden in <i>S. aureus</i>	59
2.2.3.4.5	Herstellung von Primern für die ortsspezifische Mutagenese.....	59
2.2.3.4.6	Ortsspezifische Mutagenese	59
2.2.3.4.7	Kolonie-PCR	60
2.2.3.4.8	Restriktionsverdau von Plasmiden.....	61
2.2.4	Bioinformatische Methoden	61
2.2.4.1	Identifikation und Auswahl von Referenzgenomen.....	61
2.2.4.2	Phylogenetische Analysen.....	62
2.2.4.3	Genomweite Assoziationsstudien	62
2.2.4.3.1	Genomrekonstruktion und Generierung von Input-Dateien	62
2.2.4.3.2	GWAS – PLINK Analysen.....	63
2.2.4.3.3	GWAS – SEER Analysen	64
2.2.4.4	Identifizierung seltener SNPs	65
2.2.4.5	SCCmec Analyse.....	66
3	Ergebnisse	67
3.1	Überprüfung kommerziell erhältlicher Testsysteme zur Bestimmung der DAP-MHK bei <i>S. aureus</i>	67
3.1.1	Konkordanz kommerzieller Testsysteme	67
3.1.2	Vancomycin-Resistenz von DAP-R <i>S. aureus</i> Isolaten	69
3.2	GWAS zur Identifikation Resistenz-vermittelnder Mutationen	70
3.2.1	Phylogenetische Analysen.....	70
3.2.2	Korrektur von Populationsstrukturen in PLINK	70
3.2.3	Korrektur von Populationsstrukturen in SEER.....	74
3.2.4	Identifikation von DAP-R assoziierten Mutationen	74
3.2.5	Identifikation von CPT-R assoziierten Mutationen	80
3.3	Genetische Manipulation von <i>S. aureus</i>.....	84
4	Diskussion	87
4.1	Kommerzielle Testsysteme zur Bestimmung der Empfindlichkeit von <i>S. aureus</i> gegenüber DAP generieren valide Ergebnisse.....	87

4.2 GWAS zur Detektion Resistenz-vermittelnder Mutationen in <i>S. aureus</i> – Chancen und Limitationen eines leistungsfähigen Tools	89
4.2.1 Detektion potentiell DAP-R assoziierter Mutationen	89
4.2.2 Detektion potentiell CPT-R assoziierter Mutationen	95
Abbildungsverzeichnis.....	99
Tabellenverzeichnis.....	101
Literaturverzeichnis	103
Abkürzungsverzeichnis	115
Anhang	119
Danksagung	131
Curriculum Vitae	133

Zusammenfassung

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist ein fakultativ pathogenes Bakterium, das weltweit für eine Vielzahl sowohl ambulanter als auch nosokomialer Infektionen verantwortlich ist. Insbesondere die Entstehung und Verbreitung Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA) Stämme, welche eine Resistenz gegenüber diversen antimikrobiellen Substanzen entwickelt haben, gelten als ernst zu nehmende Bedrohung für die öffentliche Gesundheit. Mit der Entwicklung neuer MRSA-wirksamer Substanzen wie Daptomycin (DAP) und Ceftarolin (CPT) wurde versucht, dieser Bedrohung entgegenzuwirken. Doch bereits kurze Zeit nach der Zulassung dieser Substanzen wurden erste Resistenzentwicklungen beobachtet, deren molekulare Grundlagen bisher nur unvollständig geklärt werden konnten.

Einige kürzlich veröffentlichte Studien haben gezeigt, dass es für verschiedene Bakterienarten möglich ist, mittels genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) genetische Varianten mit einem Phänotyp von Interesse zu assoziieren. Diese Methoden waren im Vorfeld für Eukaryoten entwickelt worden, bevor sie an bakterielle Populationen adaptiert wurden.

Zur Identifikation von Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. *single nucleotide polymorphisms*; SNPs), die signifikant mit einer DAP- bzw. CPT-Resistenz in *S. aureus* assoziiert sind, etablierten wir repräsentative Stammsammlungen von resistenten und sensiblen klinischen *S. aureus* Isolaten. In der anschließenden Assoziationstestung nutzten wir die Softwaretools PLINK und SEER, um sowohl referenzbasierte als auch Alignment-freie Algorithmen auf ihre Eignung zur Detektion potentieller Assoziationen zu untersuchen. Eine der größten Herausforderungen bakterieller GWAS besteht darin, eine durch die Populationsstruktur der Bakterien bedingte systematische Verzerrung von Ergebnissen zu vermeiden (*population stratification*). Zu diesem Zweck wurden in vorhergehenden Studien verschiedene Algorithmen entwickelt, um den genetischen Hintergrund bakterieller Populationen in der Assoziationstestung zu berücksichtigen.

Die phylogenetische Rekonstruktion der Verwandtschaftsverhältnisse verdeutlichte, dass in Abhängigkeit des betrachteten Datensatzes unterschiedliche Ausgangsbedingungen vorlagen, die eine Anpassung der GWAS an die jeweiligen Bedingungen erforderte. Während der Einfluss der *population stratification* in der homogenen DAP-Stammsammlung gering ausfiel, bedingte die starke Clusterung von CPT-R *S. aureus* Isolaten den Einsatz stringenter Korrekturmechanismen. In der DAP GWAS identifizierten wir genetische Varianten, die signifikant mit dem DAP-R Phänotyp assoziiert wurden und bereits in vorhergehenden Untersuchungen als ursächlich für die Ausbildung einer DAP-Resistenz in *S. aureus* beschrieben wurden. Zusätzlich konnten mittels vergleichender Genomanalysen weitere, bisher unbeschriebene Mutationen in *mprF* und bekannten Kandidatengenomen detektiert werden, deren Einfluss auf die DAP-Resistenzentwicklung noch bestimmt werden muss. Im Gegensatz dazu konnten wir in der CPT GWAS

aufgrund der ausgeprägten *population stratification* keine Mutationen detektieren, die signifikant mit dem CPT-R Phänotyp in *S. aureus* assoziiert wurden. Da bekannt ist, dass Mutationen innerhalb des *mecA* Gens für die Ausbildung einer CPT-Resistenz in *S. aureus* verantwortlich sein können, führten wir eine manuelle Untersuchung des Gens und der umgebenden *SCCmec* Elemente durch. In der Tat detektieren wir Mutationen innerhalb von *mecA*, die zum Teil bereits als kausal für die Etablierung einer CPT-Resistenz in *S. aureus* beschrieben wurden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Assoziationsstudien verdeutlichen das Potential von GWAS, kausale Mutationen mit einem Phänotyp von Interesse zu assoziieren. Dabei konnten wir Chancen aber auch Limitationen der angewandten Tools identifizieren, die dazu beitragen sollen, die Erfolge der Methodik in zukünftigen Studien zu maximieren.

Summary

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is a facultative pathogen that is responsible for a large number of outpatient and nosocomial infections worldwide. In particular, the development and spread of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains, which have developed resistance to a variety of antimicrobial agents, are considered a serious public health threat. With the development of new MRSA-active substances such as daptomycin (DAP) and ceftarolin (CPT), attempts were made to counteract this threat. However, shortly after the approval of these substances, first resistances were observed.

Some recently published studies have shown that by using genome-wide association studies (GWAS), it is possible to link a genetic variant with a phenotype of interest. These methods had originally been developed for eukaryotes before they have been adapted to bacterial populations.

To identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) that are significantly associated with DAP- and CPT-resistance in *S. aureus*, we used representative strain collections of resistant and susceptible clinical *S. aureus* isolates. Subsequently, we used the software tools PLINK and SEER to examine both, reference-based and alignment-free algorithms for their applicability to detect resistance associated mutations. One of the greatest challenges of bacterial GWAS is to avoid systematic inflation, that is due to strong population structure of bacteria (population stratification). To this end, various algorithms have previously been developed to take the genetic background of bacterial populations into account.

The phylogenetic reconstructions revealed that, depending on the data set analyzed, different prerequisites for the implementation of GWAS existed. Thus, an adaptation of the methods to the respective conditions was required. While the influence of population stratification in the homogeneous DAP strain collection was small, the strong clustering of CPT-R *S. aureus* isolates required the use of stringent control mechanisms. By performing DAP GWAS we found distinct genetic variants to be associated with the DAP-R phenotype, that had already been described to be causative for the development of DAP resistance in *S. aureus*. In addition, by using comparative genome analyses we detected yet undescribed mutations in *mprF* and candidate genes whose impacts on DAP resistance still have to be determined. In contrast, due to strong population stratification, no statistically significant SNPs or K-mers could be detected in CPT GWAS. Since it is known that mutations within *mecA* may be responsible for the development of CPT resistance in *S. aureus*, we manually examined *mecA* and its surrounding *SCCmec* elements. In fact, we were able to detect mutations within *mecA*, some of which have already been described as causative for the development of CPT resistance.

The GWAS performed in this thesis demonstrate the potential of this method to associate causal mutations with a phenotype of interest. Additionally, we were able to describe chances and limitations of the applied tools, that may contribute to the success of upcoming studies.

1 Einleitung

1.1 Staphylococcus aureus

1.1.1 Staphylococcus aureus als Humanpathogen

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist ein Gram-positives Bakterium, das bei Menschen als natürlicher Besiedler der Haut und der Schleimhäute des Oropharynx vorkommt [1]. Die Rate der Träger von *S. aureus* variiert in der gesunden Normalbevölkerung zwischen 30 % und 50 % [2]. Personen die mit *S. aureus* kolonisiert sind, haben ein erhöhtes Risiko für nachfolgende Infektionen und fungieren als Quelle für die Mensch-zu-Mensch Übertragung [3]. Wird die natürliche Haut- und Schleimhautbarriere verletzt, z.B. durch chirurgische Eingriffe, Verletzungen oder Katheterisierung, kann *S. aureus* als opportunistischer Erreger lokal-superfizielle, tiefinvasive und systematische Infektionen verursachen [4]. Obwohl einer *S. aureus* Infektion häufig eine Kolonisierung vorausgeht (endogene Infektion durch Stämme der körpereigenen Flora), treten in seltenen Fällen auch Infektionen auf, die durch Stämme der Umgebung erfolgen (exogene Infektion; z.B. durch kontaminierte medizinische Produkte oder unzureichende Umsetzung von Hygienestandards durch das medizinische Personal) [3, 5].

Bei der Etablierung einer Infektion im Wirtsorganismus steht *S. aureus* eine Vielzahl diverser Virulenzfaktoren zur Verfügung, die zur Pathogenität des Erregers beitragen. Da viele Virulenzgene jedoch auf mobilen genetischen Elementen (MGEs) lokalisiert sind, kann sich die Zusammensetzung der Virulenzfaktoren zwischen klonalen Linien und selbst eng verwandten Stämmen erheblich unterscheiden [3]. In der Regel wird *S. aureus* über Handkontakte in Mikroläsionen oder offene Wunden der Haut transferiert, wo zellwandständige Proteine wie der Verklumpungsfaktor (ClfA, ClfB) und das Fibronektin-bindende Protein (FnBPA) (sogenannte MSCRAMMs; engl. *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) dazu dienen, die Adhäsion des Bakteriums an die Komponenten der extrazellulären Matrix zu vermitteln (z.B. Kollagen und Fibronektin) [3, 6]. Durch die Produktion des Proteins Koagulase bewirkt *S. aureus* die Bildung eines verkapselten Abszesses im Gewebe, der sowohl den Erreger, als auch infiltrierte Granulozyten (engl. *polymorphonuclear leukocytes*, PMNs) einschließt und das Eindringen weiterer Leukozyten verhindert [3]. Die Fähigkeit von PMNs *S. aureus* zu eliminieren wird durch die Anwesenheit von Virulenzfaktoren (insbesondere Leukozidinen) limitiert, die die Opsonophagozytose stören und zu einer allmählichen Zersetzung der PMNs führen. Zu diesen von *S. aureus* sekretierten Virulenzfaktoren gehören sowohl porenbildende Toxine wie α -Hämolysine, Phenol-lösliche Moduline und das Pantan-Valentine-Leukozidin (PVL), als auch Oberflächenproteine wie das Protein A (Spa), welches das durch die B-Zellen gebildete Immunglobulin G (IgG) an der Fc-Region bindet und auf diese Weise die Opsonierung und Phagozytose von *S. aureus* verhindert [3, 7]. Zusätzlich produzieren einige *S. aureus* Stämme Superantigene, wie das *toxic shock syndrome toxin* (TSST), die an

den Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse II von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (z.B. Makrophagen oder dendritische Zellen) binden und zu einer unspezifischen Aktivierung von T-Zellen führen. Diese Aktivierung resultiert in einer systemischen Hyperinflammation, die auch als Zytokinsturm bezeichnet wird [8]. Im späteren Verlauf einer Infektion kann es zu einer Auflösung der Abszesse und einer Übertragung des Pathogens in die Blutbahn kommen. Die Folge ist eine Bakteriämie, welche unter suboptimalen Therapieverläufen zu systemischen Entzündungen, Sepsis und Multiorganversagen führen kann [3].

1.1.2 Besondere Bedeutung von MRSA

Von besonderer klinischer und epidemiologischer Relevanz sind vor allem solche Infektionen, die durch Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) Stämme verursacht werden. Obwohl die durch MRSA und Methicillin-sensiblen *S. aureus* (MSSA) Stämme bedingten Infektionserkrankungen im Wesentlichen dieselben sind, unterscheiden sich MRSA von MSSA vor allem durch die Anwesenheit einer chromosomalen Region, die als *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec) bezeichnet wird. Dieses MGE trägt in der Regel die Resistenzdeterminante *mecA*, dessen Produkt (das Penicillin bindende Protein 2a (PBP2a)) eine Resistenz gegenüber Methicillin und den meisten β -Laktam-Antibiotika vermittelt (vergl. 1.2.3.1) [9, 10]. Da seit Mitte der 90er Jahre Infektionen mit MRSA auch außerhalb von Krankenhäusern auftreten und seit 2005 in verstärktem Maße mit der kommerziellen Nutztierhaltung assoziiert werden, erfolgt eine Einteilung in *hospital acquired* MRSA (HA-MRSA), *community acquired* MRSA (CA-MRSA) und *livestock associated* MRSA (LA-MRSA).

1.1.2.1 HA-MRSA

1.1.2.1.1 Bedeutung von HA-MRSA

HA-MRSA treten vor allem in medizinischen Einrichtungen auf und tendieren dazu, Infektionserkrankungen wie Haut- und Weichteilinfektionen aber auch schwerwiegende systemische Infektionen wie Blutstrominfektionen (BSI) und Pneumonien auszulösen [11]. Die entsprechenden Stämme sind vorrangig mit den SCCmec Typen I, II und III assoziiert und weisen in der Regel Resistenzen gegenüber ≥ 3 Antibiotika auf [11]. Hierzu gehören Makrolidantibiotika, Clindamycin, Fluorchinolonantibiotika aber auch Tetracyclin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol [12]. Als typische Risikofaktoren für den Erwerb einer nosokomialen MRSA Infektion gelten vorangegangene Hospitalisierungen und Antibiotikatherapien, der Kontakt mit kolonisierten Patienten oder die Anwesenheit perkutaner Medizinprodukte und Katheter [2, 13-15]. Das Risiko einer Infektion ist bei kolonisierten und immunkomprimierten Patienten sowie Personen mit offenen Wunden deutlich erhöht [14, 16-18]. Die Ursachen für die Verbreitung von MRSA in medizinischen Einrichtungen sind

multifaktoriell, gehen im Wesentlichen aber auf die Hospitalisierung kolonisierter Patienten, eine inkonsequente Umsetzung von Hygienestandards und die hohe Tenazität des Erregers zurück [19]. Die Übertragung von HA-MRSA erfolgt primär über Kontaktinfektionen, Schmierinfektion und Tröpfcheninfektionen [19, 20].

1.1.2.1.2 Verbreitung von HA-MRSA

Schon kurz nach der ersten Beschreibung von *S. aureus* Isolaten mit einer Unempfindlichkeit gegenüber Methicillin in einem britischen Krankenhaus in dem Jahr 1961 folgte die Ausbreitung von HA-MRSA Klonen über die Landesgrenzen hinweg [21-23]. Zu den ersten HA-MRSA, die vorwiegend in europäischen Gesundheitseinrichtungen zirkulierten, gehörte der archaische Klon (z.B. *S. aureus* COL (Sequenztyp (ST) 250)), der ab den 1980ern aus bisher unbekannten Gründen nur noch selten in medizinischen Einrichtungen beobachtet wurde [24]. Mit der Zeit etablierten sich Nachkommen dieses Klonen und weitere erfolgreiche HA-MRSA Linien, die sich global verbreiteten und noch heute für eine Vielzahl *S. aureus* bedingter Infektionen verantwortlich gemacht werden können. Hierzu gehören der iberische Klon (ST 247), der brasilianische Klon (ST 239), der ungarischen Klon (ST 239), der New York/Japan Klon (ST 5) und der pädiatrisch-pandemische MRSA Klon (ST 5) [25-27]. In den meisten Ländern der EU sind gegenwärtig vor allem Isolate der klonalen Komplexe (engl. *clonal complex*, CC) 5, 8 und 22 prominent [24]. In Abhängigkeit des betrachteten Landes kann dabei eine variierende Prävalenz von HA-MRSA beobachtet werden, wobei ein Nord-Süd-Gefälle erkennbar ist (vergl. Abbildung 1). Diese Beobachtungen gehen vermutlich auf uneinheitliche Bemühungen der Mitgliedsstaaten zurück, die Ausbreitung von HA-MRSA zu verhindern [28]. In deutschen Krankenhäusern traten HA-MRSA Infektionen erstmals in den 1970er und 1980er Jahren auf [29, 30]. Zu den heute in Deutschland am weitesten verbreiteten HA-MRSA gehören Isolate der klonalen Linien ST 225/ST 5 (Rhein-Hessen Epidemiestamm) und ST 22 (Barnim Epidemiestamm) [31, 32]. Der Anteil invasiver MRSA Isolate (gemessen an dem Anteil aller invasiven *S. aureus*) beläuft sich auf 10,3 % und zeigt damit seit 2010 (20,9 %) einen rückläufigen Trend (vergl. Abbildung 2).

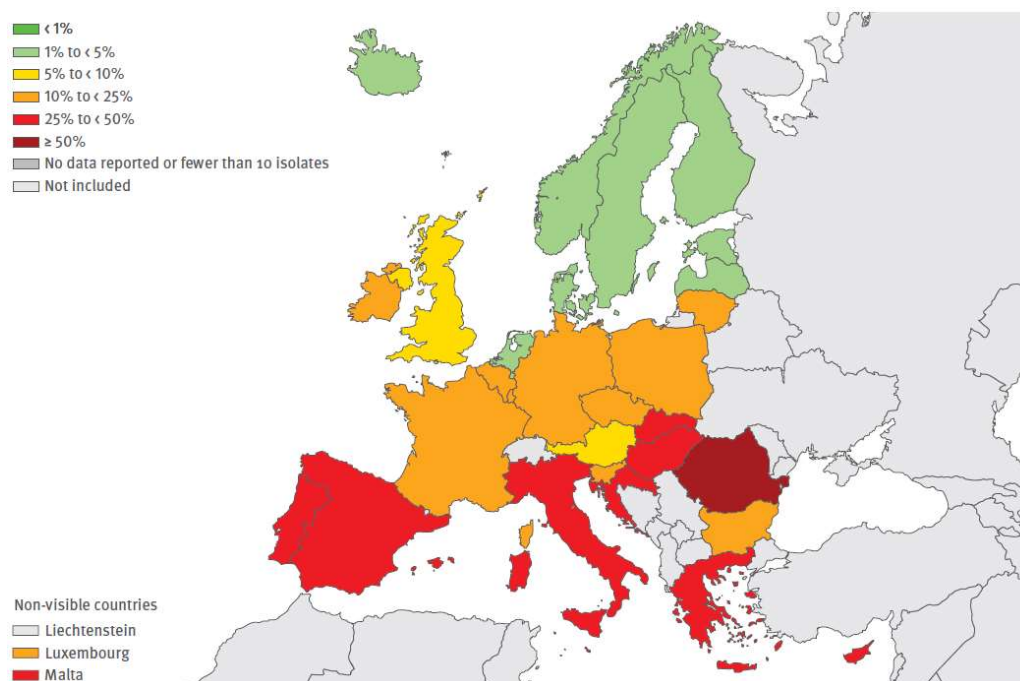


Abbildung 1 | Prävalenzen invasiver MRSA Isolate in der EU und den Ländern des europäischen Wirtschaftsraumes in 2016. Die Häufigkeiten (gemessen an dem Anteil aller invasiven *S. aureus*) sind in Prozent [%] angegeben. Quelle: Surveillance Report, Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016 (www.ecdc.europa.eu).

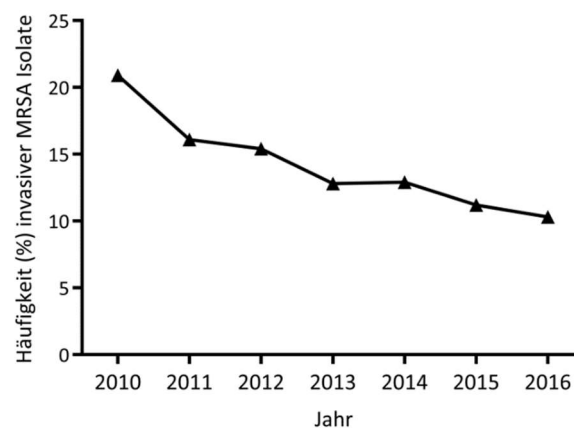


Abbildung 2 | Häufigkeit invasiver *S. aureus* Isolate mit einer Resistenz gegenüber Methicillin in Deutschland von 2010 bis 2016. Häufigkeit [%] gemessen an dem Anteil aller invasiven *S. aureus* Isolate, die zu dem gegebenen Zeitpunkt getestet wurden. Quelle: Surveillance Reports, Surveillance of antimicrobial resistance in Europe (www.ecdc.europa.eu).

1.1.2.2 CA-MRSA

1.1.2.2.1 Bedeutung von CA-MRSA

In den frühen 90er Jahren beobachteten Kliniker vermehrt Infektionen mit MRSA, die bei Patienten ohne typische Risikofaktoren und unabhängig von Aufenthalten in medizinischen Einrichtungen auftraten [33-36]. Diese Infektionen gingen auf sogenannte CA-MRSA zurück, die sich hinsichtlich des Genotyps von HA-MRSA unterschieden, vor allem bei jungen, immunkompetenten Menschen auftraten und mit einer gesteigerten Virulenz und Fitness assoziiert wurden [33, 37, 38]. Dabei stehen CA-MRSA vorwiegend mit Haut- und Weichteilinfektionen, selten mit nekrotisierender Pneumonie und Sepsis im Zusammenhang [33, 37, 39]. Aufgrund der Empfindlichkeit gegenüber den meisten nicht- β -Laktam Antibiotika können CA-MRSA bedingte Infektionen meist effektiv therapiert werden [40]. Dies könnte sich jedoch mit der Verbreitung eines zwischen Staphylokokken übertragbaren Plasmids ändern, welches erst kürzlich in einem CA-MRSA beschrieben wurde und eine Resistenz gegenüber Vancomycin (VAN) vermittelt [41].

In den frühen Anfängen der CA-MRSA Epidemie gingen Wissenschaftler davon aus, dass CA-MRSA aufgrund epidemiologischer Marker, wie der Anwesenheit des PVL und des SCCmec Typ IV, von HA-MRSA unterschieden werden können [24, 33, 42, 43]. Heutzutage ist jedoch bekannt, dass CA-MRSA Klone zum Teil diverse SCCmec Elemente tragen und mitunter keine *lukSF-PV* Gene (Gene, die für das PVL kodieren) aufweisen [40, 44]. Darüber hinaus ist bekannt, dass einige erfolgreiche HA-MRSA Klone, wie der in England prävalente ST 22 EMRSA-15, das SCCmec Typ IV tragen [45]. In dem Jahr 2000 veröffentlichten die Zentren für Krankheitskontrolle und Prävention (engl. *US Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)) eine epidemiologische Definition von CA-MRSA, nach der MRSA Infektionen als CA-MRSA Infektionen eingestuft werden, sofern sie ambulant oder innerhalb der ersten 48 Stunden nach der stationären Aufnahme diagnostiziert wurden und keine spezifischen MRSA Risikofaktoren vorliegen (z.B. Hämodialyse, perkutane Medizinprodukte oder vorangegangene Operationen) [33, 40]. Studien haben jedoch gezeigt, dass diese Richtlinien, insbesondere in den USA, zu einer starken Unterschätzung der durch CA-MRSA Isolate verursachten Krankheitslast führen [46]. Dieser Umstand geht auf die steigende Anzahl von MRSA Infektionen in medizinischen Einrichtungen zurück, die durch CA-MRSA verursacht werden [47-49]. Aus diesem Grund schlugen Otter und French in dem Jahr 2012 vor, genotypische Methoden in die Bewertung von CA- und HA-MRSA mit einzubeziehen, um eine spezifische Charakterisierung der Erreger und eine angepasste Therapie der Patienten zu ermöglichen [50].

1.1.2.2.2 Verbreitung von CA-MRSA

Seit Mitte der 1990er wurden verschiedene klonale Linien von CA-MRSA in Ländern wie den USA (ST 8), Kanada (ST 8), Taiwan (ST 59) und Australien (ST 30) zunehmend endemisch und wurden hier vor allem in solchen Personenkreisen zu einer wachsenden Belastung, die keinen Zugang zur medizinischen Grundversorgung haben [33]. In Europa und im Speziellen in Deutschland, ist die Prävalenz von CA-MRSA noch gering. Hier sind vorrangig Isolate der klonalen Linien ST 8, ST 30 und ST 80 vertreten, deren Verbreitung (mit Ausnahme von ST 80) auf einen Import aus den Ländern zurückzuführen ist, in denen diese CA-MRSA häufig vorkommen [32, 33].

1.1.2.3 LA-MRSA

1.1.2.3.1 Bedeutung von LA-MRSA

Im Laufe der letzten Jahre hat sich ein drittes Reservoir von MRSA etabliert, welches vor allem mit der kommerziellen Nutztierhaltung in Verbindung steht. Diese sogenannten LA-MRSA treten vorwiegend bei Personen auf, die direkten Kontakt zu Nutztieren haben [51]. Hierzu zählen nicht nur Landwirte und Veterinärmediziner sondern auch Personen, die in engem Kontakt zu landwirtschaftlichen Nutztieren stehen, z.B. Mitarbeiter von Tiertransportunternehmen oder Schlachthöfen [51]. Eine Verbreitung über diesen Personenkreis hinaus scheint jedoch selten aufzutreten [52]. Das Ausmaß der Besiedlung mit LA-MRSA hängt vor allem von der Expositionsdauer und der Intensität des Kontaktes mit den Tieren ab [53]. Darüber hinaus kann eine Übertragung des Erregers durch Umweltkontaminationen (z.B. das Ausbringen von Gülle) und den Kontakt mit Produkten des infizierten Tieres (z.B. kontaminiertes Fleisch) erfolgen [54]. Da LA-MRSA eine ähnlich Pathogenität wie HA-MRSA besitzen, sind sie mit den gleichen Krankheitsbildern assoziiert [54]. Hierzu zählen sowohl Haut- und Weichteilinfektionen aber auch nosokomial erworbene Infektionen wie beatmungsassoziierte Pneumonien, Infektionen nach einer Gelenkarthoplastik oder Septikämien [54]. Im Gegensatz zu humanen MRSA tragen LA-MRSA üblicherweise keine Gene für das PVL, das TSST-1 und nur in seltenen Fällen Gene, die für Enterotoxine (z.B. SEA und SEB) kodieren. Bei Infektionen, die einer antibiotischen Behandlung bedürfen, bietet das aktuelle Antibiotika-Resistenzprofil von LA-MRSA ausreichende Therapieoptionen [54].

1.1.2.3.2 Verbreitung von LA-MRSA

Die ersten Fälle von MRSA, die mit Tieren in industriell geführten Mastanlagen assoziiert wurden, traten im Jahr 2005 in den Niederlanden auf [54]. Bereits kurze Zeit später folgten weitere Berichte aus europäischen Mitgliedsstaaten, in denen intensive Tiermast betrieben wird, darunter Dänemark und Deutschland [55]. Die detektierten Isolate gehörten hauptsächlich zu dem CC 398, der üblicherweise mit einem Reservoir aus Schweinen und Rindern assoziiert wird [56]. Später konnten LA-MRSA aus diesem

CC auch in Nordamerika nachgewiesen werden [56]. Während LA-MRSA CC 398 am weitesten in Europa und den USA verbreitet ist, scheinen in Asien vor allem Isolate aus dem CC 9 dominant vertreten zu sein [56]. Die Verbreitung von LA-MRSA ist dabei maßgeblich von dem Ausmaß der Nutztierhaltung abhängig und weist folglich länder- und ortsspezifische Schwankungen auf [57]. In Deutschland beläuft sich der Anteil von LA-MRSA an MRSA aus tiefgehenden Haut- und Weichteilinfektionen auf ca. 17 % und der Anteil aus nosokomialen Infektionen auf 1,8 % [58]. Im Gegensatz zu HA-MRSA ist eine Ausbreitung im Krankenhaus jedoch selten [58].

1.1.2.4 Detektion von MRSA

Zur Detektion von MRSA aus klinischen Proben stehen mikrobiologischen Laboratorien sowohl molekulare als auch nicht-molekulare Methoden zur Verfügung. Dabei können MRSA mittels moderner Methoden deutlich schneller nachgewiesen werden als mit traditionellen Verfahren [59]. Zu den traditionellen Methoden der MRSA Detektion gehört die Anzucht auf Nährböden mit anschließender Empfindlichkeitstestung [59]. Seit der Einstellung des Vertriebs von Methicillin als Arzneimittel wurde Oxacillin (OXA) zur Bestimmung der Methicillin-Resistenz bei *S. aureus* verwendet. Da Cefoxitin (FOX) jedoch zu einer deutlich stärkeren Expression des *mecA* Regulator Systems führt, wird gegenwärtig die Verwendung von FOX empfohlen [34]. Obwohl dieses Verfahren sehr zuverlässig ist, können bis zu 72 h vergehen, bis ein Ergebnis vorliegt. In den letzten Jahren wurden chromogene Kulturmedien entwickelt, die eine Identifikation von MRSA innerhalb von 24 h ermöglichen. Diese Selektivmedien erlauben den gleichzeitigen Nachweis von *S. aureus* Kolonien anhand einer Farbreaktion und die Selektion des resistenten Phänotyps durch die Anwesenheit des entsprechenden Antibiotikums [59]. Des Weiteren ist es möglich, MRSA anhand des Nachweises von *mecA* (bzw. *mecC*, siehe 1.2.3.1) oder dessen Produkt, das PBP2a, mittels einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) bzw. einem Latex Agglutinationstest innerhalb von 24 h nachzuweisen [59]. Dieses Verfahren ist jedoch in der Detektion von MRSA aus nativem Probenmaterial limitiert (z.B. Nasenabstrich), in dem auch Koagulase-negative Staphylokokken beobachtet werden [60]. Aus diesem Grund wurden im Laufe der letzten Jahre PCR gestützte Testverfahren entwickelt, die sowohl Sequenzen aus *mecA/mecC* als auch taxonomisch relevante DNA-Sequenzen verwerten und bereits innerhalb weniger Stunden Ergebnisse generieren können [61, 62]. Neben diesen Ansätzen wurden auch vollautomatisierte und einfach zu bedienende Testsysteme wie das VITEK-2 System entwickelt, welche innerhalb weniger Stunden (4 – 15 h) zuverlässige Ergebnisse hinsichtlich der Identifikation von *S. aureus* liefern [63].

1.2 Antibiotikaresistenzen in Bakterien

1.2.1 Antibiotika

Antibiotika sind Chemotherapeutika, die zu der Gruppe der Antiinfektiva zählen und der Behandlung bakterieller Infektionskrankheiten dienen. Sie werden in der Regel von Bakterien oder Pilzen produziert, können aber auch semi-synthetisch (aus natürlichen Produkten) oder vollsynthetisch (auf Grundlage der Struktur der natürlichen Produkte) hergestellt werden [64]. Jedes Antibiotikum weist ein individuelles Wirtsspektrum und einen individuellen Wirkungsmechanismus auf. Grundsätzlich wirken die natürlichen Substanzen oder synthetischen Derivate in Abhängigkeit ihrer Zielstrukturen bakteriostatisch (Hemmung des Zellwachstums) oder bakterizid (Vermittlung des Zelltodes) [65]. Dabei zeigen Antibiotika selbst in geringsten Konzentrationen eine hohe Effektivität in der Bekämpfung bakterieller Erreger, ohne den Wirtsorganismus substantiell zu schädigen. Dieses Prinzip wird als selektive Toxizität bezeichnet und geht auf den Umstand zurück, dass die involvierten Zielstrukturen der Antibiotika nicht in humanen Zellen vorkommen. Zu den wichtigsten Zielstrukturen gehören Bestandteile und Proteine der bakteriellen Zellwand, der Cytoplasmamembran, der DNA-Replikation, der Transkription, der Translation und des intermediären Stoffwechsels (vergl. Abbildung 3) [65, 66].

1.2.2 Grundlage der Antibiotikaresistenz in Bakterien

Seit rund 100 Jahren werden antimikrobielle Substanzen zur Behandlung bakterieller Infektionskrankheiten genutzt. Mit dem Einsatz dieser Substanzen wird jedoch gleichzeitig die Entwicklung resistenter Bakterienstämme getriggert, die als natürliche Antwort auf den generierten Selektionsdruck entstehen [67]. Für die Ausbildung einer Antibiotikaresistenz bei Bakterien sind in der Regel zwei Komponenten notwendig: der antimikrobielle Wirkstoff, der zur Selektion von resistenten Stämmen führt und die genetische Determinante, durch welche die Resistenz vermittelt wird [68]. Dabei können die genetischen Determinanten durch verschiedene Mechanismen und MGEs wie Plasmide, Bakteriophagen, nackte DNA oder Transposons zwischen Bakterien ausgetauscht werden (vergl. Abbildung 3). Neben der Akquisition von MGEs kann es aber auch zu einer schrittweisen Akkumulation von SNPs in den genetischen Elementen des Chromosoms kommen, die die Ausbildung einer Antibiotikaresistenz bedingen [69].

1.2.3 Antibiotikaresistenzen in Bakterien mit dem Fokus auf *S. aureus*

Um der schädlichen Wirkung antimikrobieller Substanzen zu entgehen, haben Bakterien infolge des entstandenen Selektionsdrucks multiple Resistenzmechanismen entwickelt (vergl. Abbildung 3). So können bakterielle Erreger membranständige Transportproteine exprimieren die dazu dienen, Antibiotika aus der Zelle zu transportieren (vergl. Abbildung 3). Auf diese Weise wird verhindert, dass die Substanzen

ihre spezifischen Angriffspunkte erreichen und in ausreichenden Konzentrationen akkumulieren [70]. *S. aureus* exprimiert in Anwesenheit von Tetracyclin beispielsweise spezifische Effluxpumpen, die das Antibiotikum aktiv aus der Zelle schleusen [71]. Des Weiteren können Bakterien ihre Zellwand dahingehend modifizieren, dass die Zellpenetration des Antibiotikums verhindert wird (vergl. Abbildung 3). Auf diese Weise haben Staphylokokken als Antwort auf VAN verdickte Zellwände generiert, wodurch das Antibiotikum vor dem Erreichen des lethalen Zielmoleküls (Lipid-II) abgefangen wird [72]. Zusätzlich exprimieren einige Bakterien Enzyme, die zu einer Modifikation oder einem Abbau des Antibiotikums führen und damit zu einer Inaktivierung der antimikrobiellen Substanz (vergl. Abbildung 3). Ein klassisches Beispiel ist die hydrolytische Deaktivierung des β -Laktamrings von Penicillinen und Cephalosporinen durch bakterielle β -Laktamasen [73]. Eine dritte Resistenzstrategie konzentriert sich nicht auf die Entfernung oder Zerstörung des Antibiotikums, sondern auf eine Modifikation des Targets, wodurch die Bindungsaffinität der antimikrobiellen Substanz zum Zielprotein herabgesetzt oder eine Bindung gar verhindert wird. Ein prominentes Beispiel ist die Modifikation von Penicillin bindenden Proteinen (PBPs) und der Erwerb des PBP2a, welches die molekulare Basis des MRSA-Phänotyps bildet [70].

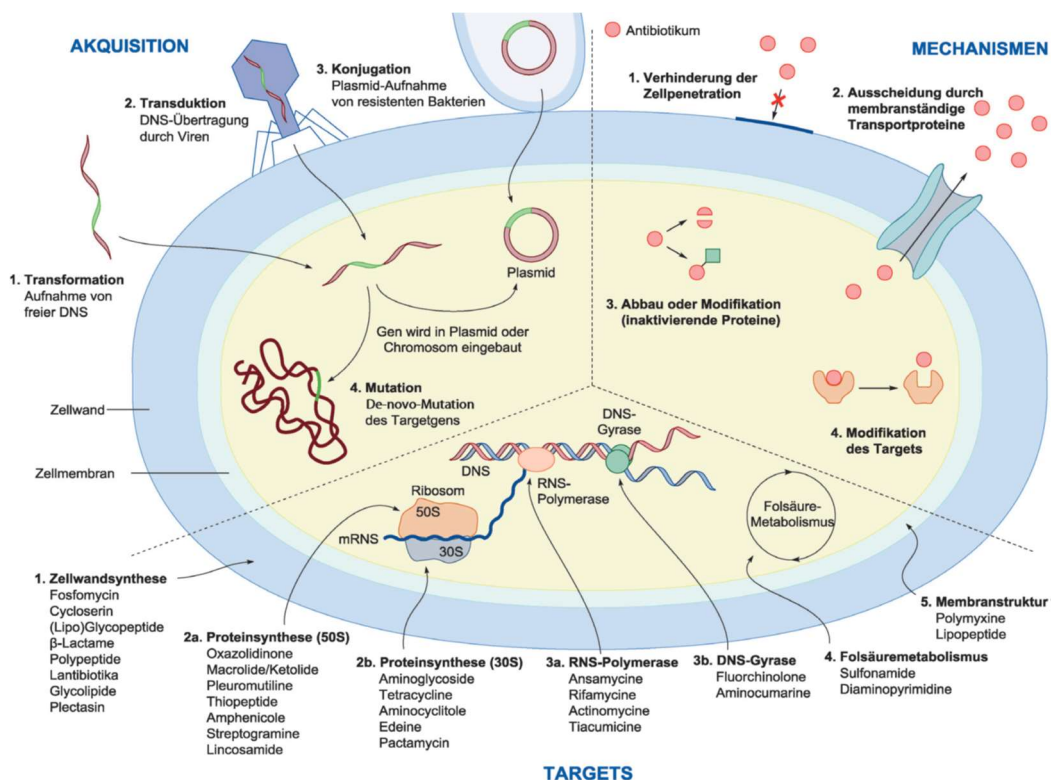


Abbildung 3 | Beispielhafte Darstellung antimikrobieller Zielstrukturen, des Erwerbs von Resistenzen und der involvierten Resistenzmechanismen. Quelle: Chellat *et al.*, 2016, Antibiotikaresistenzen gezielt überwinden, Angewandte Chemie (<https://doi.org/10.1002/ange.201506818>).

1.2.3.1 β -Laktamresistenz in *S. aureus*

Mit der Entdeckung der PBPs machten Forscher einen wesentlichen Schritt zum Verständnis des Wirkmechanismus von Penicillin. Die membrangebundenen PBPs gehören zu der Gruppe der Transpeptidasen, welche in die Peptidoglykan-Biosynthese der bakteriellen Zellwand involviert sind [74]. Im Wesentlichen katalysieren sie hierbei die Polymerisation (Transglykosylierung) und Quervernetzung (Transpeptidierung) der Glykanstränge [74]. Der Wirkmechanismus des Penicillins beruht auf der Strukturanalogie des Antibiotikums zu dem natürlichen Substrat der PBPs, dem D-Ala-D-Ala-Dipeptid des Peptidoglykan-Bausteins [75]. Durch die Reaktion des Penicillins mit dem aktiven Serin der PBPs entsteht ein stabiles, schlecht hydrolysierbares Acylenzym, dessen aktives Zentrum blockiert ist. Hierdurch wird die Quervernetzung des Mureins verhindert und die Proliferation der Organismen gehemmt [70, 76].

Schon kurz nach der Einführung des Penicillins folgte eine Welle von Penicillin resistenten *S. aureus* Isolaten [24]. Mitte der 1940er konnten Bondi und Dietz die spezifische Rolle der Penicillinase (β -Laktam-spaltendes Enzym) an der Ausbildung dieses Resistenzphänotyps identifizieren [77]. Heutzutage ist bekannt, dass die *S. aureus* β -Laktamase durch *blaZ* kodiert wird, welches in der Regel auf einem Plasmid lokalisiert vorliegt [78]. In Anwesenheit von Penicillin wird die β -Laktamase exprimiert, die den β -Laktam-Ring des Antibiotikums spaltet (vergl. 1.2.3) [78]. Infolge dieser Entwicklungen wurden erste β -Laktamase-feste Penicilline wie Methicillin entwickelt, die auf Grundlage einer modifizierten Struktur die Öffnung des β -Laktam-Rings verhindern.

Die Einführung von Methicillin kennzeichnete den Beginn einer zweiten Resistenzwelle von *S. aureus* Isolaten, die eine Resistenz gegenüber allen damals verfügbaren β -Laktamase-festen Penicillinen, Cephalosporinen und Carbapenemen aufwiesen [2]. Das wesentliche Charakteristikum dieser MRSA Isolate ist die Expression des *mecA* kodierten PBP2a, das in klinischen *S. aureus* Isolaten hoch konserviert vorliegt und im Gegensatz zu anderen PBPs eine geringe Affinität gegenüber β -Laktamen aufweist [79, 80]. Das *mecA* Gen ist in einer chromosomalen Region lokalisiert, die als *SCCmec* bezeichnet wird und nicht in Methicillin-empfindlichen *S. aureus* (MSSA) vorkommt [9, 10]. Da *SCCmec* nicht nur in *S. aureus*, sondern auch in weiteren Koagulase-positiven und Koagulase-negativen *Staphylococci* vertreten ist, gehen Wissenschaftler davon aus, dass diese Region als mobiles genetisches Element zwischen Staphylokokkenarten übertragbar ist [81]. Über die Herkunft und Entstehung von *SCCmec* ist allerdings nur wenig bekannt [81, 82]. Es wird jedoch angenommen, dass die Evolution der Kasette ihren Ursprung in mehreren primitiven Staphylokokkenarten hat, darunter *S. fleurettii*, *S. vitulinus* und *S. sciuri* [83, 84]. Seit der ersten Beschreibung von *SCCmec* in dem Jahr 2000 konnten insgesamt 13 *SCCmec* Typen identifiziert werden (I - XIII), die anhand ihrer genetischen Komposition charakterisiert werden [9, 85]. Der Angriffspunkt der β -Laktam-Antibiotika, das aktive Serin 403, ist in einer der tiefen Tasche der Transpeptidase-Domäne von PBP2a lokalisiert, welche für die meisten β -Laktame nicht zugänglich ist [86].

Da die Transglykosidase-Aktivität des PBP2 in Anwesenheit von β -Laktamen nicht beeinträchtigt wird, kann PBP2a in Kooperation mit PBP2 die Peptidoglykan-Biosynthese der Bakterien aufrechterhalten [87].

Heutzutage ist bekannt, dass die Anwesenheit unterschiedlicher *mecA* Varianten zu einer Unempfindlichkeit von *S. aureus* gegenüber Methicillin führen kann. In 2011 beschrieb die Arbeitsgruppe um Garcia-Alvarez ein neuartiges *mecA* Homolog, *mecC*, welches ursprünglich einem tierischen MRSA Isolat entstammte und eine 70-prozentige Sequenzhomologie zu *mecA* aufweist [88]. Des Weiteren berichteten Becker *et al.* kürzlich von einem Plasmid-vermittelten *mecB* in *S. aureus* (61,7 % Sequenzhomologie zu *mecA*), welches zwar für *Macrococcus caseolyticus*, aber bislang nicht für Staphylokokken-Spezies beschrieben wurde [89, 90]. Die Übertragung der Methicillin-Resistenz über ein Plasmid birgt die Gefahr einer beschleunigten Verbreitung von MRSA und damit den Verlust von β -Laktamen als effektive Therapie gegen Staphylokokken-bedingte Infektionen.

Aufgrund steigender Zahlen von MRSA mit einer Resistenz gegenüber multiplen Antibiotikagruppen wurden neuartige Wirkstoffe entwickelt (sog. Reserveantibiotika), die eine ausgeprägte Aktivität gegenüber MRSA zeigen und nur im Falle schwerwiegender Infektionen eingesetzt werden. Zu diesen Antibiotika gehören Substanzen wie VAN [91], Linezolid [92], Daptomycin [93] und Ceftarolin (ein β -Laktam-Antibiotikum der 5. Generation) [94]. Obwohl die Antibiotika eine vielversprechende MRSA Aktivität zeigten, wurden schon kurze Zeit nach der Zulassung erste Resistenzentwicklungen beobachtet, die eine ernsthafte Bedrohung für die öffentliche Gesundheit darstellen [93, 94].

1.2.3.2 Ceftarolin-Resistenz in *S. aureus*

Im Laufe der letzten 50 Jahre erweiterte sich die Familie der β -Laktam Antibiotika um zahlreiche natürliche und semisynthetische Derivate, die mit verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften und einem erweiterten Wirtsspektrum aufwarten können. Doch nur CPT und Ceftobiprol, die den semisynthetischen Cephalosporin-Antibiotika der 5. Generation angehören, zeigten eine vielversprechende Wirkung gegen MRSA [71]. In dem Jahr 2012 wurde CPT in Europa für schwerwiegende Haut- und Weichteilinfektionen sowie ambulant erworbene Lungenentzündungen zugelassen [95]. In den USA ist es bereits seit 2010 erhältlich [96]. Da CPT als Zwitterion vorliegt, ist das Antibiotikum in seiner nativen Form nur schwer wasserlöslich. Um die Verabreichung als parenterale Injektionslösung zu ermöglichen, wurde die Wasserlöslichkeit des Antibiotikums durch Anfügen einer Phosphongruppe gesteigert [96]. Die Phosphongruppe des pharmakologisch inaktiven Ceftarolinfosamil wird im Blutplasma abgespalten, wodurch der aktive Wirkstoff CPT freigesetzt wird [97].

Wie bei allen β -Laktam Antibiotika, beruht die Wirksamkeit von CPT auf der Strukturanalogie des Antibiotikums zum natürlichen Substrat der Transpeptidasen, dem terminalen D-Ala-D-Ala-Segment des wachsenden Peptidoglykan-Stranges [75]. Im Gegensatz zu anderen β -Laktamen bindet CPT jedoch mit

hoher Affinität an die allosterische Domäne des PBP2a Proteins [98]. Diese Domäne wurde durch kristallographische Analysen identifiziert und stellt ein Alleinstellungsmerkmal von PBP2a dar [99]. Interessanterweise ist die allosterische Domäne 60 Ångström (Å) vom aktiven Zentrum des Proteins entfernt und bindet neben CPT Bestandteile des Peptidoglykans (z.B. Muraminsäuren) [99]. Aus diesem Grund wurde postuliert, dass die allosterische Domäne dem Zweck dient, die wachsenden Peptidoglykan-Stränge zu erkennen und infolgedessen eine Konformationsänderung des Proteins herbeizuführen, welche zur Öffnung des aktiven Zentrums führt [99]. Wissenschaftler gehen davon aus, dass die Konformationsänderung über ein Signal vermittelt wird, welches über ein Netzwerk von Salzbrücken an die katalytische Domäne von PBP2a übermittelt wird [99]. In einem Liganden-freien Zustand ist das aktive Serin 403 (S403) innerhalb einer schmalen Vertiefung der aktiven Domäne geschützt, wodurch die Wirksamkeit üblicher β -Laktam-Antibiotika aufgehoben wird (vergl. 1.2.3.1) [100]. Durch die Bindung eines Liganden an der allosterischen Domäne erhöht sich das Volumen der aktiven Seite, von $\sim 500 \text{ Å}^3$ auf 1300 Å^3 [100]. Die Erweiterung des aktiven Zentrums und die damit einhergehende Exposition des S403 ermöglicht folglich eine Interaktion zwischen CPT und dem aktiven Serin. Da die Rate der Deacylierung sehr gering ist, entsteht eine kovalente Bindung, die den Funktionsverlust von PBP2a bedingt und die Zellwandsynthese von MRSA Isolaten inhibiert [100].

Schon kurz nach der Einführung des Cephalosporin-Antibiotikums berichteten einige Studien von klinischen *S. aureus* Isolaten mit einer Unempfindlichkeit gegenüber CPT, die vor allem mit Mutationen in PBP2a einherging [94, 101-103]. Die beschriebenen PBP2a-Mutationen lassen sich dabei in Abhängigkeit der involvierten Wirkmechanismen grob in zwei Kategorien einteilen [104]. In der ersten Kategorie befinden sich solche Mutationen, die in dem aktiven Zentrum der Transpeptidase-Domäne (TPD) von PBP2a auftreten und die direkte Bindung von CPT beeinflussen (vergl. Abbildung 4). Diese Mutationen korrelieren in der Regel mit hohen CPT-MHKs [101]. In der zweiten Kategorie sind Mutationen vertreten, die innerhalb und außerhalb der allosterischen Domäne von PBP2a auftreten (vergl. Abbildung 4) [105]. Wissenschaftler vermuten, dass diese Mutationen die Signalkaskade blockieren, welche für die Öffnung des aktiven Zentrums der Transpeptidase-Domäne verantwortlich ist und somit die Acylierung des aktiven Serins verhindern [105]. Alm *et al.* vermuten außerdem, dass Mutationen in der nPBD zu einer Destabilisierung der Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen PBP2a und PBP2 führen und eine Interaktion mit weiteren PBPs fördern [94].

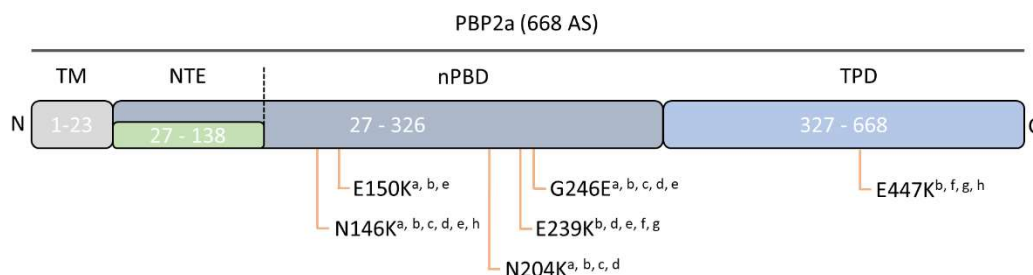


Abbildung 4 | Schematische Darstellung von PBP2a mit potentiell CPT-R assoziierten Mutationen. PBP2a ist in die Peptidoglykan-Synthese der bakteriellen Zellwand involviert und weist eine geringe Affinität gegenüber β -Laktamen auf. Das Protein besteht aus einem N-terminalen Transmembran-Anker (TM), einer nicht-Penicillin-bindenden Domäne (engl. *nonpenicillin-binding domain*, nPBD) und einer C-terminalen Transpeptidase-Domäne (TPD), die das aktive Serin 403 enthält [86]. Die am häufigsten beschriebenen Mutationen (sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Mutationen) sind unterhalb gezeigt. Referenzen: a, Mendes *et al.*, 2012 [Quelle]; b, Alm *et al.*, 2014 [Quelle]; c, Schaumburg *et al.*, 2015 [Quelle]; d, Strommenger *et al.*, 2015 [Quelle]; e, Kelly *et al.*, 2015 [Quelle]; f, Lahiri *et al.*, 2015 [Quelle]; g, Long *et al.*, 2014 [Quelle]; h, Lee *et al.*, 2018 [106]. NTE: N-terminale Erweiterung (engl. *N-terminal extension*).

Trotz der offensichtlichen Bedeutung von PBP2a an der Etablierung einer CPT-Resistenz in *S. aureus* sind sich Wissenschaftler einig, dass auch *mecA*-unabhängige Faktoren zu der Entwicklung einer CPT-Resistenz in *S. aureus* beitragen [102, 107]. Eine besondere Rolle scheint hier das nicht-essentielle PBP4 einzunehmen, welches eine geringe Affinität gegenüber CPT aufweist und bereits in vorhergehenden Studien mit einer Resistenz gegenüber β -Laktamen in Verbindung gebracht wurde, inklusive solchen β -Laktamen, die gegen MRSA wirksam sind [108].

1.2.3.3 Daptomycin-Resistenz in *S. aureus*

In Europa wurde DAP in 2006/2007 von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) zur Behandlung komplizierter Haut- und Hautstrukturinfektionen (SSSI), rechtsseitiger Endokarditis und Bakteriämie zugelassen [109]. In den USA ist es bereits seit 2003 als Therapeutikum verfügbar [109]. Bei dem bakterizid wirkenden Antibiotikum handelt es sich um ein zyklisches Lipopeptid, das eine strukturelle Ähnlichkeit zu dem von Säugetieren produzierten kationischen antimikrobiellen Peptid (engl. *cationic antimicrobial peptide*, CAMP) LL-37 aufweist [110]. Diese Ähnlichkeit hat Wissenschaftler zu der Annahme veranlasst, dass die Wirkmechanismen von DAP und CAMPs auf ähnlichen Vorgängen beruhen [110, 111].

In Anwesenheit von Kalzium-Ionen (Ca^{2+}) bildet DAP kleine Mizellen aus (14 – 16 Moleküle), die den Transport des Antibiotikums zur bakteriellen Zellmembran fördern [112]. Sobald der DAP-Komplex die bakterielle Zellmembran erreicht hat, kommt es zu einer Dissoziation des Multimers, wodurch die Insertion der DAP-Moleküle in die äußere Lipidschicht der Membran initiiert wird [112]. Dieser Prozess ist von der Verfügbarkeit des negativ geladenen Membranbestandteils Phosphatidylglycerol (PG) abhängig und wird durch Ca^{2+} gefördert [110]. Der Umstand, dass PG als Mediator für die Insertion von DAP

fungiert, erklärt vermutlich auch die eingeschränkte Aktivität des Antibiotikums bei Gram-negativen Erregern, da diese in der Regel einen deutlich geringeren Anteil von PG in der Zellmembran aufweisen (abgesehen von dem Umstand, dass diese zusätzlich eine äußere Membran besitzen) [110]. Über die Prozesse, welche nach der Insertion des DAP in die bakterielle Zellmembran ablaufen, sind sich Wissenschaftler noch uneinig. Die in der Literatur am häufigsten beschriebene Hypothese umfasst die Oligomerisierung von DAP in der äußersten Schicht der Zellmembran, wodurch der Austausch von Lipiden zwischen der inneren und äußeren Zellmembranoberfläche stimuliert wird. Der Transport von DAP-Molekülen zur inneren Zellmembranoberfläche veranlasst die Formation kleiner Poren, die unter *in vivo* Bedingungen zu einem Einstrom von Natrium-Ionen (Na^+) und letztlich zur Depolarisation der Zellmembran und damit zum Zelltod des Bakteriums führen [113-115]. Obwohl DAP als Reserveantibiotikum bereits zur Behandlung schwerwiegender MRSA Infektionen eingesetzt wird, bewegt sich die Anzahl von klinischen *S. aureus* Stämmen mit einer Unempfindlichkeit gegenüber DAP (DAP-R) seit Einführung des Antibiotikums auf einem konstant niedrigen Level [116]. Trotz dieser positiven Beobachtungen beschreiben einige klinische Berichte die *in vivo* Entwicklung von DAP Resistenzen bei klinischen MRSA Isolaten, die mit einem Therapieversagen einhergingen [69, 117-120].

Eine Unempfindlichkeit von *S. aureus* gegenüber DAP sowie CAMPs wird in erster Linie durch die bakterielle Phosphatidylglycerol Lysyltransferase (engl. *multipeptide resistance factor*, *MprF*) vermittelt [121, 122]. Das bifunktionale Membranprotein besteht aus einer hydrophoben N-terminalen Domäne und einer konservierten, hydrophilen C-terminalen Domäne, die der Übertragung eines Lysin-Rests auf das negativ geladene PG dient (vergl. Abbildung 5) [121, 123]. Das positiv geladene Lysyl-Phosphatidylglycerol (L-PG) wird anschließend über die Translokase Domäne des Proteins zur äußeren Zellmembranoberfläche transportiert, wodurch die positive Ladung der bakteriellen Zelloberfläche gesteigert wird [110].

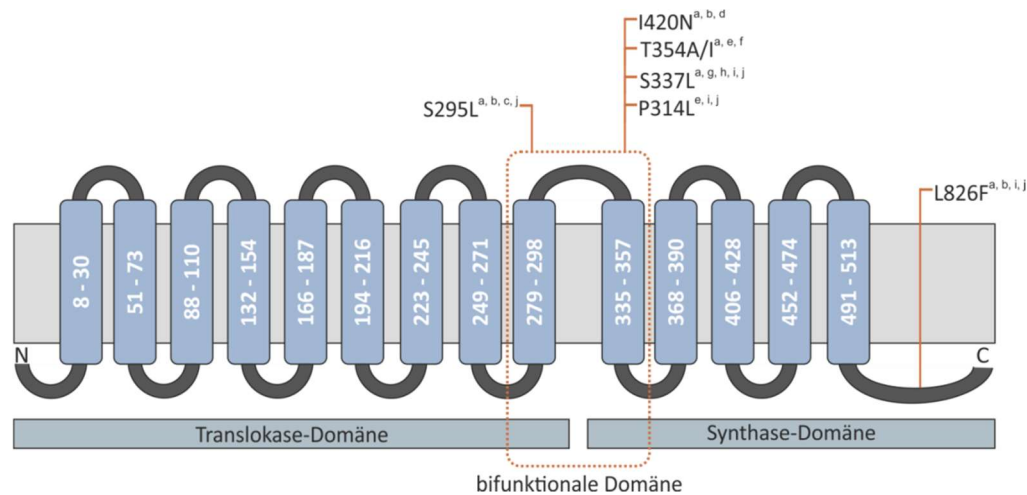


Abbildung 5 | Schematische Darstellung von MprF mit potentiell DAP-R assoziierten Mutationen. MprF ist ein bifunktionales Protein, welches das positiv geladene L-PG synthetisiert und zur äußeren Zellmembranoberfläche transportiert. Das Protein besteht aus einer C-terminalen Synthase-Domäne, einer N-terminalen Translokase-Domäne und einer bifunktionalen Domäne. Die in der Literatur am häufigsten beschriebenen Mutationen (sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Mutationen) sind oberhalb gezeigt. Referenzen: a, Peleg *et al.*, 2012 [124]; b, Mishra *et al.*, 2011 [125]; c, Yang *et al.*, 2009 [126]; d, Julian *et al.*, 2007 [119]; e, Friedman *et al.*, 2006 [127]; f, Murthy *et al.*, 2008 [128]; g, Pillai *et al.*, 2007 [129]; h, Boyle-Vavra *et al.*, 2011 [130]; i, Steed *et al.*, 2013 [131]; j, Berti *et al.*, 2015 [132].

Im Laufe der Adaption von *S. aureus* an DAP treten in der Regel zuerst Aminosäuresubstitutionen (ASS) innerhalb definierter Hot-Spot Regionen von MprF auf, die mit einem Aktivitätsgewinn des Proteins assoziiert sind (vergl. Abbildung 5) [133]. In Abhängigkeit der betroffenen Region gehen die Mutationen entweder mit einer erhöhten Translokase-Aktivität des Proteins oder einer exzessiven Überproduktion von L-PG einher. Die dadurch herbeigeführte Ladungsänderung (erhöhte positive Oberflächenladung) der bakteriellen Zelloberfläche führt letztlich zu der Abstoßung des Kalzium-komplexierten DAP [113, 133]. *S. aureus* Isolate, deren *mprF* Gen deletiert wurde, zeigen eine Hypersensibilität gegenüber DAP und unterstützen die Bedeutung von MprF an der Ausbildung dieses Resistenzphänotyps [134].

In einer Studie von Mehta *et al.* konnten die Autoren zeigen, dass resistenzvermittelnde Mutationen in *mprF* nicht immer mit einer Änderung der Oberflächenladung des Bakteriums einhergehen [135]. Daher ist es wahrscheinlich, dass weitere Faktoren zur Etablierung einer DAP Resistenz in *S. aureus* beitragen. Als Kandidaten gelten ASS in PgsA (ein Enzym, das in die Produktion von PG involviert ist), welche möglicherweise zu einer Beeinflussung der Proteinfunktion und folglich zu einer Reduktion des Anteils von PG in der bakteriellen Zellmembran führen [124]. Da das negativ geladene PG als Mediator für die Insertion von DAP fungiert und ein einziges PG Molekül ausreicht, um die Oligomerisierung von DAP auszulösen, resultiert ein verminderter Anteil des Membranlipids vermutlich in einer reduzierten Insertionseffizienz der DAP-Moleküle [124, 133, 136]. Neben *pgsA* ist auch die Cardiolipin-Synthase (*cls2*) in die Biosynthese von Membran-Phospholipiden involviert [137]. Das Membran-gebundene Enzym

synthetisiert aus zwei PG das anionische Cardiolipin, welches unter Stresskonditionen bis zu 30 % der Membran-Phospholipide ausmachen kann und trägt damit wahrscheinlich zu einer ladungsbedingten Abstoßung des *de facto* kationischen DAP bei [124, 137]. Neben Genen, die direkt in die Biosynthese von Membran-Phospholipiden involviert sind, wurden in vorhergehenden Studien potentiell DAP-R assoziierte Mutationen in *yycG* und *yycF* beschrieben, welche für das essentielle zwei-Komponenten Regulationssystem YycFG kodieren (auch bekannt unter WalKR) [124, 125, 127]. Dieses System reguliert in Reaktion auf äußere Einflüsse die Expression einer Reihe von Genen, die an der Homöostase der Zellwand von *S. aureus* beteiligt sind (z.B. *mprF*, *dlt*, *fadB*, *altA* und *lytM*) [138]. So konnten Fischer *et al.* in klinischen DAP-R *S. aureus* Isolaten zeigen, dass Mutationen in diesem System sowohl zu einer Änderung der bakteriellen Oberflächenladung, als auch zu einer dickeren Zellwand und einer erhöhten Membran-Fluidität führen [139]. In der Tat wurden selbige Charakteristika bereits in vorhergehenden Untersuchungen mit einer gesteigerten Resistenz von *S. aureus* gegenüber DAP, VAN und CAMPs in Verbindung gebracht [125, 140-143]. Dabei beeinflusst die modifizierte Fluidität vermutlich die Fähigkeit von kationischen Peptiden, an die bakterielle Zellmembran zu binden und/oder Oligomere zu bilden [133]. Aus diesem Grund wird angenommen, dass DAP und CAMPs eine optimale Phospholipid-Membranzusammensetzung benötigen, um eine Insertion in die bakterielle Zellmembran zu initiieren [110]. Ein weiteres Enzym, das möglicherweise in die Etablierung einer DAP Resistenz von *S. aureus* involviert ist, ist die DNA-abhängige RNA Polymerase, welche sich aus 5 Untereinheiten zusammensetzt (α_2 - (RpoA), β - (RpoB), β' - (RpoC), ω -Untereinheit (RpoZ)) [113, 144]. In vorhergehenden Studien wurden sowohl für *rpoB* als auch *rpoC* Mutationen beschrieben, die möglicherweise mit erhöhten DAP-MHKs in *S. aureus* korrelieren und mit verdickten Zellwänden und einer verringerten negativen Oberflächenladung der Bakterien einhergehen [124, 127, 145, 146].

1.3 Ganzgenomsequenzierung in der klinischen Mikrobiologie

Die Mehrheit klinischer Laboratorien setzt seit vielen Jahren diverse Methoden zur Typisierung pathogener Bakterien ein. Hierzu gehören sowohl phänotypische als auch genotypische Methoden. Zu den phänotypischen Methoden zählen z.B. die Serotypie, die Phagen-Typisierung und die Erstellung von Antibigrammen [147]. Mit der Entwicklung von genombasierten Methoden gelang es jedoch, Verwandtschaftsverhältnisse wesentlich feiner zu differenzieren und genetische Profile zu erzeugen, die einem einzigartigen Fingerabdruck ähneln [148]. Am Anfang dieses Prozesses standen Methoden im Fokus der Entwicklung, die sich auf kurze Abschnitte des bakteriellen Genoms konzentrierten [149]. Hierzu gehört z.B. der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP), die Pulsfeld Gelelektrophorese (PFGE) und die Multi Locus Sequenz Typisierung (MLST) [149]. Obwohl die Verfahren noch heute weitverbreitet Anwendung finden, weisen sie in Abhängigkeit des angewandten Systems Defizite hinsichtlich der Vergleichbarkeit zwischen Laboratorien, der taxonomischen Trennschärfe und der artenübergreifenden Anwendbarkeit auf [148].

Die Sequenzierung des ersten kompletten bakteriellen Genoms in dem Jahr 1995 kennzeichnete den Beginn einer rasanten Entwicklung verschiedener Sequenzierplattformen [150]. Heutzutage können mikrobielle Genome mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) Methoden relativ kosteneffizient und mit hoher Präzision sequenziert werden (vergl. Abbildung 6). Dieser Fortschritt resultierte in der Generierung von Genomdaten, die eine einzigartige Auflösung bei der Differenzierung von selbst eng verwandten Stämmen bieten [149]. Durch die effiziente Sequenzierung ganzer Genome (engl. *Whole Genome Sequencing*, WGS) eröffnen sich heutzutage neue Möglichkeiten Pathogene zuverlässig zu identifizieren, hochauflösende epidemiologische Studien durchzuführen und Resistenz- bzw. Virulenzmarker aus Genomdaten abzuleiten (selbst wenn diese *in vitro* nicht exprimiert werden) [151, 152]. Eine der ersten Anwendungen von WGS im öffentlichen Gesundheitswesen war die Identifikation von epidemiologischen Zusammenhängen bei nosokomialen Infektionen, wie bei einem Ausbruch von *Acinetobacter baumannii* in dem Jahr 2010 in einem britischen Krankenhaus [153]. In den folgenden Jahren wurde WGS vermehrt zur Aufklärung Krankenhaus-assoziiierter Ausbruchsgeschehen eingesetzt, z.B. bei MRSA und Carbapenem-resistenten *Klebsiella pneumoniae* [154, 155]. Die umfangreichste Implementierung von WGS erfolgte jedoch im Bereich der Überwachung lebensmittelbedingter Infektionen [156]. In den USA und Frankreich wird dieser Ansatz zur Überwachung Listerien-bedingter Infektionskrankheiten eingesetzt und führte zu einer deutlich effektiveren Detektion und Aufklärung entsprechender Ausbrüche [157, 158]. Obwohl die Vorzüge von WGS für die Detektion und Untersuchung von Ausbruchsgeschehen offensichtlich sind, weisen Kliniker auf die noch hohen Kosten hin, die im Rahmen von WGS anfallen und den Nutzen dieses Ansatzes für die Diagnose und Behandlung einzelner Patienten in Frage stellt [156].

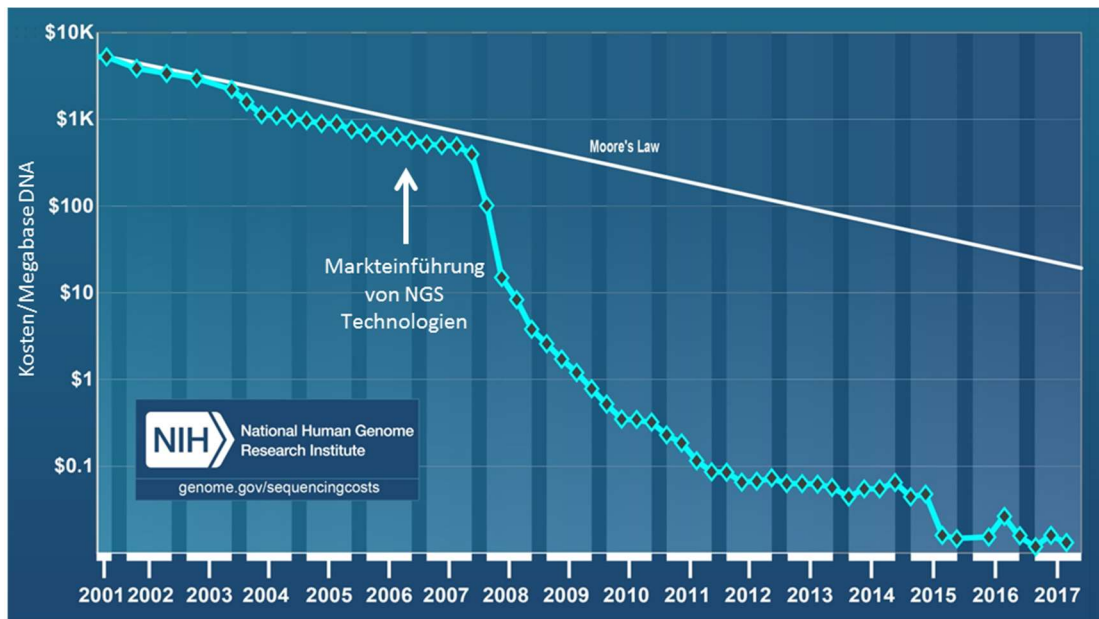


Abbildung 6 | Entwicklung der Kosten für sequenzierte DNA von 2001 – 2017. Die Kosten sind pro Megabase DNA in Dollar (\$) angegeben. Zwischen 2005 und 2007 wurden NGS Technologien auf den Markt eingeführt. Quelle: Wetterstrand KA. DNA Sequencing Costs: Daten des NHGRI *Genom Sequencing Program* (GSP). Verfügbar auf www.genome.gov/sequencingcostsdata. Zugriff am 31.05.2018.

Neben den epidemiologischen Anwendungsgebieten kann WGS auch zur Vorhersage phänotypischer Merkmale, wie Antibiotikaresistenzen oder Virulenzeigenschaften eines bestimmten Pathogens, eingesetzt werden [159, 160]. In einer Studie von Köser *et al.* erstellten die Autoren ein artifizielles „Resistom“ (die Gesamtheit aller Resistenzgene und deren Vorläufer in einem Bakterium) von MRSA Isolaten aus einem neonatalen Ausbruchsgeschehen und zeigten, dass die genombasierten Vorhersagen mit den Ergebnissen der phänotypischen Empfindlichkeitstestung übereinstimmten [161]. Trotz dieses Fortschrittes muss die Interpretation solcher Daten kritisch hinterfragt werden, da sie weder eine Vorhersage zur Expression bestimmter Gene, noch ihres Expressionsniveaus erlauben und in der Detektion komplexer Resistenzmechanismen limitiert sind [162]. Interessanterweise wurden in den letzten Jahren Genom-basierte Methoden entwickelt, die es nicht nur ermöglichen einzelne Loci, sondern komplexe genetische Muster mit einem Phänotyp von Interesse zu assoziieren.

1.4 Genomweite Assoziationsstudien

1.4.1 Entstehung genomweiter Assoziationsstudien

Auf der Suche nach genetischen Determinanten, die zur Ausbildung eines Phänotyps von Interesse führen, gewinnen genomweite Assoziationsstudien (GWAS) sowohl in der Humanmedizin als auch Mikrobiologie seit einigen Jahren vermehrt an Bedeutung [163]. Im Gegensatz zu klassischen Methoden sind GWAS nicht auf die Untersuchung spezifischer Loci beschränkt, sondern erlauben die statistische Testung aller detektierten genetischen Varianten auf eine Assoziation zur beobachteten Merkmalsausprägung [164].

Mit der Sequenzierung des ersten humanen Genoms und der Entdeckung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) wurde die Grundlage für GWAS geschaffen [165, 166]. Dieser Fortschritt resultierte in der Entwicklung von DNA-Microarrays, die tausende von SNPs im Hochdurchsatzverfahren detektieren/typisieren konnten [167]. Die wachsende Verfügbarkeit humaner Genome und die damit steigende Anzahl bekannter SNPs ermöglichte die Durchführung der ersten humanen GWAS, in der Klein *et al.* eine Assoziation zwischen altersbedingter Makuladegeneration und dem *cfh*-Gen detektierten [168]. Obwohl GWAS seither mit großen Erfolgen in der Humanbiologie eingesetzt werden, fand die Methodik erst Jahre später Anwendung in der klinischen Mikrobiologie [168-171]. Diese Verzögerung ging vor allem auf die hohen Fixkosten zurück, die mit der Anfertigung von DNA-Microarrays verbunden waren und die limitierte Verfügbarkeit von Plattformen, die für Bakterien konzipiert wurden [164]. Mit dem Aufkommen von NGS-Verfahren und den sinkenden Kosten pro Megabase sequenzierter DNA änderte sich die Verfügbarkeit bakterieller Genomdaten jedoch schlagartig (vergl. Abbildung 6 und Abbildung 7).

Aufgrund der ausgeprägten Populationsstruktur und der genetischen Variabilität von Bakterien mussten die in der Humanbiologie bereits etablierten Methoden zur Durchführung von GWAS angepasst werden [163, 172]. Durch die Entwicklung von Software-Tools wie PLINK [173], PhyC [174], ROADTRIPS [175] und SEER [176], welche Korrekturmechanismen und Algorithmen zur Berücksichtigung der entsprechenden Faktoren bereitstellten, kamen die Entwickler den Anforderungen des neuen Einsatzgebietes nach. So gelang es Farhat *et al.* im Jahr 2013 mittels PhyC konvergent entstandene Mutationen in *Mycobacterium tuberculosis* zu detektieren, die mit einer Resistenz gegenüber Tuberkulostatika assoziiert wurden [174]. Nur ein Jahr später identifizierte die Arbeitsgruppe um Laabei in einer PLINK GWAS Loci, die signifikant mit der Toxizität von MRSA Isolaten korrelierten [177]. Zusätzlich gelang es einigen Arbeitsgruppen Assoziationsstudien in Größenordnungen humaner GWAS durchzuführen, die zu einem erweiterten Verständnis von der Etablierung komplexer Resistenzmechanismen in Bakterien führten [178, 179]. Die Studien zeigen das Potential von GWAS, bakterielle Phänotypen auf genomweitem Level mit neuen Loci und/oder Mutationen zu assoziieren. Mit der wachsenden Verfügbarkeit bakterieller Genome ergibt sich damit die Chance eine Vielzahl kausaler Mutationen zu detektieren, die zukünftig dafür genutzt werden

können, Virulenz- oder Resistenzeigenschaften eines Pathogens vorherzusagen und Erreger-spezifische Therapien zu ermöglichen.

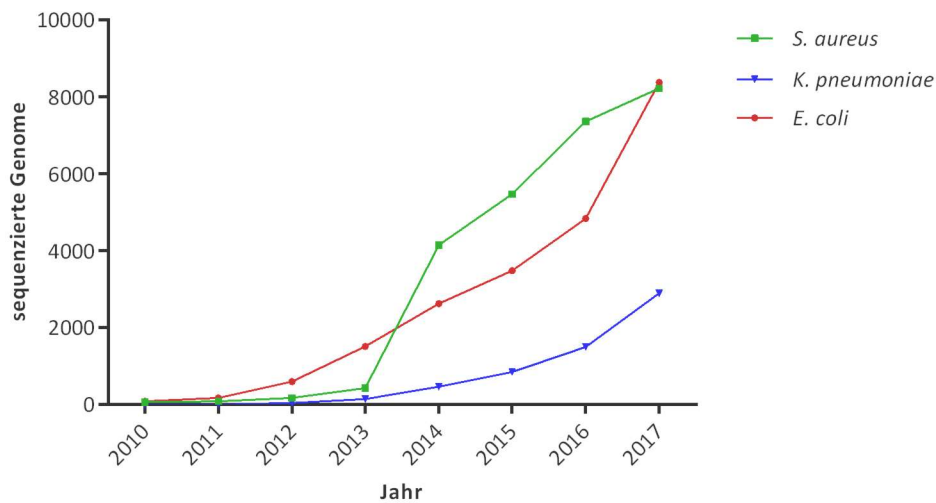


Abbildung 7 | Anstieg der kumulativen Anzahl von sequenzierten Genomen über einen Zeitraum von 10 Jahren (2010 – 2017). Dargestellt ist die kumulative Anzahl der sequenzierten Genome von drei klinisch relevanten bakteriellen Pathogenen, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*). Es wurden alle Assemblierungslevel (Contig, Scaffold, Chromosom und komplett) erfasst. Quelle: National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

1.4.2 Funktionsweise bakterieller GWAS

GWAS dienen der Detektion von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen, indem sie nach genetischen Varianten suchen, die statistisch signifikant mit einem beobachteten Phänotyp assoziiert sind [180]. Als gängigste genetische Einheiten dienen dabei SNPs oder K-mere (definierte Sequenzabfolge mit der Länge k) [176, 177, 181]. Die häufigsten Formen einer GWAS bilden Fall-Kontroll Studien, welche Allelfrequenzen zwischen zwei Gruppen unterschiedlicher Phänotypen vergleichen [137, 138, 141]. Ist ein spezifisches Allel in den Fallisolaten relativ zu den Kontrollisolaten überrepräsentiert, so gilt diese genetische Variante als mit dem Phänotyp assoziiert und damit als Kandidat, um die Variation der beobachteten Merkmalsausprägung zu erklären [143].

Die Durchführung einer GWAS gliedert sich in der Regel in vier Phasen. In der ersten Phase werden Studienisolate mit einem distinkten Phänotyp gesammelt und mit einer geeigneten Kontrollgruppe ergänzt [182]. Der zu testende Phänotyp kann dabei sowohl in kontinuierlicher (z.B. MHK) als auch in binärer (z.B. resistent vs. sensibel) Form vorliegen [164]. Da die Bestimmung des Phänotyps für eine GWAS von grundlegender Bedeutung ist, muss dieser reproduzierbar sein und sollte im Idealfall im Hochdurchsatzverfahren bestimmt werden können [183]. In der zweiten Phase einer GWAS werden Ganzgenomdaten generiert, die zur Rekonstruktion der bakteriellen Genome genutzt werden. Im Falle einer SNP-basierten Assoziationsstudie erfolgt die Genomrekonstruktion anhand eines Referenzgenoms.

Angesichts der teilweise stark ausgeprägten Plastizität von Bakterien muss jedoch bedacht werden, dass diese Methoden auf die Detektion von Mutationen des Kern-Genoms beschränkt sind [176]. Um neben Mutationen etwaige Rekombinationsereignisse oder Unterschiede im Gengehalt zu detektieren, selbst wenn diese nicht in allen Isolaten auftreten, wurden Alignment-freie Ansätze entwickelt, die auf K-mere und *de novo* assemblierte Reads zurückgreifen [176]. Diese Ansätze ermöglichen nicht nur die Untersuchung des gesamten genetischen Materials, sondern umgehen auch die Beschränkungen klassischer SNP-Methoden, die in Form von unzureichenden Rechenkapazitäten und einer limitierten Verfügbarkeit bakterieller Referenzgenome auftreten [184]. In der dritten Phase einer GWAS erfolgt die statistische Testung der genetischen Varianten auf eine Assoziation zur beobachteten Merkmalsausprägung. Konnten SNPs oder K-mere auf genomweitem Level mit dem Phänotyp von Interesse assoziiert werden, so müssen im Folgenden die funktionellen Auswirkungen der genetischen Varianten auf den Phänotyp experimentell untersucht werden [182].

1.4.3 Störfaktoren bakterieller GWAS

Eine der größten Herausforderungen bei der Durchführung einer GWAS besteht darin, die Detektion falsch positiver Assoziationen zu verhindern [163]. Als Hauptfaktoren, die maßgeblich zu dieser Problematik beitragen, gelten ausgeprägte Populationsstrukturen und der Einfluss des Kopplungsungleichgewichts (engl. *Linkage Disequilibrium*, LD).

In Eukaryoten treten Rekombinationsereignisse hauptsächlich in Form des Crossing-overs auf. Eine neu gebildete Mutation wird so lange mit den benachbarten Allelen verknüpft sein, bis ein Rekombinationsereignis eintritt, das diese Verknüpfung aufhebt (vergl. Abbildung 8) [164]. Folglich werden auf dem Chromosom nahegelegene Varianten, zwischen denen Rekombinationsereignisse nur selten auftreten, häufig zusammen vererbt [184]. Dieser Effekt wird als LD bezeichnet und beschreibt den Grad, mit dem Allele an zwei verschiedenen Stellen miteinander korrelieren [184]. Das Ausmaß der LD nimmt in der Regel mit zunehmenden Abstand auf dem Chromosom ab [164]. Der Austausch von Allelen führt dabei zu der Ausbildung von Varianten, die unabhängig vom genetischen Hintergrund auftreten und ist somit essentiell, um kausale Mutationen (direkte Assoziationen) von passiv verknüpften Varianten (indirekte Assoziationen) zu unterscheiden [164].

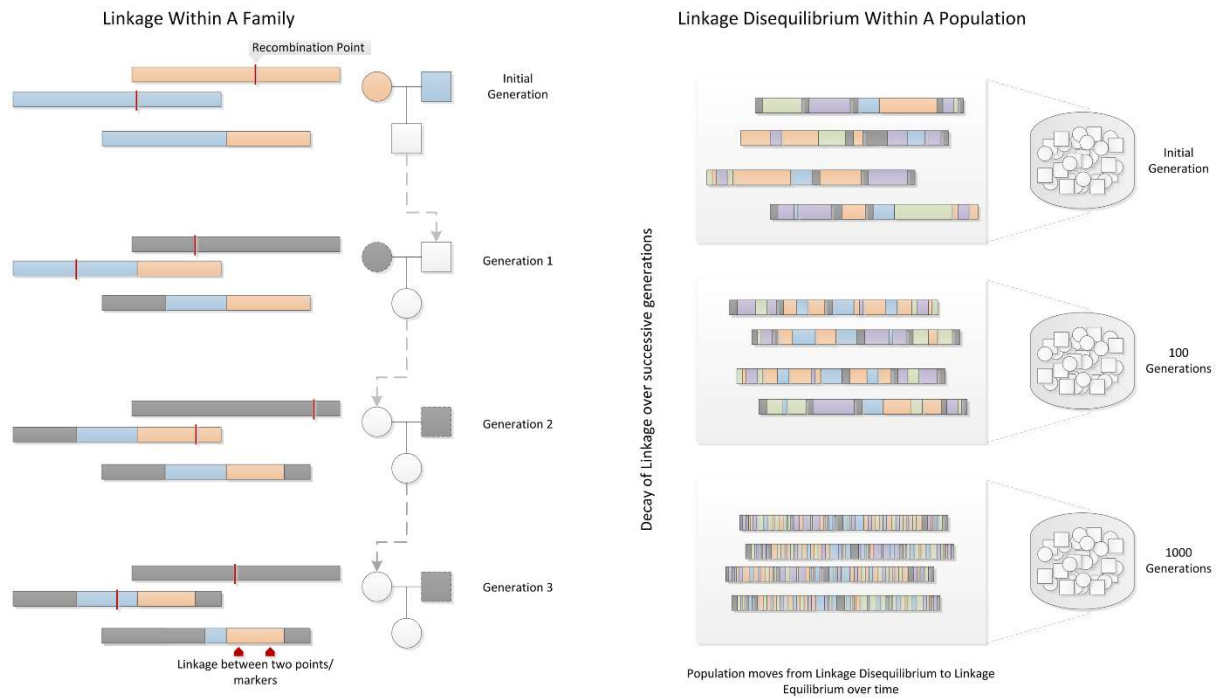


Abbildung 8 | Linkage Disequilibrium (LD). Innerhalb einer Familie trennen Rekombinationsereignisse (rote Striche) chromosomale Elemente voneinander. Dieser Effekt wird in einer Population verstärkt, die sich über Generationen hinweg zufälligen Paarungen unterzieht, bis sich alle Allele in der Population im Kopplungsgleichgewicht befinden. Quelle: Bush und Moore, 2012 (<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002822>).

Im Gegensatz zu Eukaryoten bietet die asexuelle Vermehrung von Bakterien nicht die Möglichkeit, genetische Informationen in einer vergleichbar hohen Frequenz auszutauschen. Da das gesamte Chromosom von Generation zu Generation als identische Kopie an die Tochterzellen vererbt wird, ist die Problematik des LD gerade bei Bakterien signifikant [184]. Rekombinationsereignisse, die das LD zum Teil aufheben können, erfolgen bei Bakterien vorrangig über die Prozesse des horizontalen Gentransfers (Transformation, Transduktion und Konjugation) [163]. Dabei variiert die Häufigkeit von Rekombinationsereignissen in Abhängigkeit der betrachteten Spezies [185-187]. *S. aureus* wird in der Literatur weitestgehend als klonal beschrieben. Obwohl die genetische Diversifizierung von *S. aureus* primär auf Punktmutationen zurückzuführen ist, können Rekombinationsereignisse das Genom über lange evolutionäre Zeiträume prägen [188, 189]. Kommt es in einer solchen Population zu der Ausbildung einer Phänotyp-assoziierten Mutation an einem Ahnenzweig, so ist die Wahrscheinlichkeit für die Vererbung an die Nachkommen hoch (vergl. Abbildung 9A). Es entsteht eine Situation, in der sich Subpopulationen bilden, deren Mitglieder den Phänotyp von Interesse tragen und im Durchschnitt enger miteinander verwandt sind, als zu den Mitgliedern der übrigen Population. Obwohl eine GWAS in einem solchen Szenario theoretisch dazu befähigt ist, die kausale Mutation zu identifizieren, würden im gleichen Zuge alle Mutationen, die die phylogenetische Klade charakterisieren, im gleichen Maße mit dem Phänotyp assoziiert werden. Während eine humane GWAS aufgrund der exponentiellen Abnahme des

Grades des Kopplungsungleichgewichts die Assoziation auf eine einzelne Region begrenzen könnte, wird die Position der kausalen Mutation in bakteriellen GWAS gänzlich verschleiert, da sich das Kopplungsungleichgewicht über das gesamte Genom erstreckt (vergl. Abbildung 9A). Dieses Phänomen wird in Assoziationsstudien als *population stratification* bezeichnet [190]. Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Szenario können Mutationen aufgrund ähnlicher Selektionsbedingungen (z.B. Anwesenheit von antimikrobiellen Substanzen) unabhängig voneinander in unterschiedlichen klonalen Linien entstehen (Homoplasie, vergl. Abbildung 9B). Diese sogenannten konvergenten SNPs bleiben mit der untersuchten Merkmalsausprägung assoziiert, sind jetzt jedoch nicht mehr mit dem genetischen Hintergrund korreliert [184].

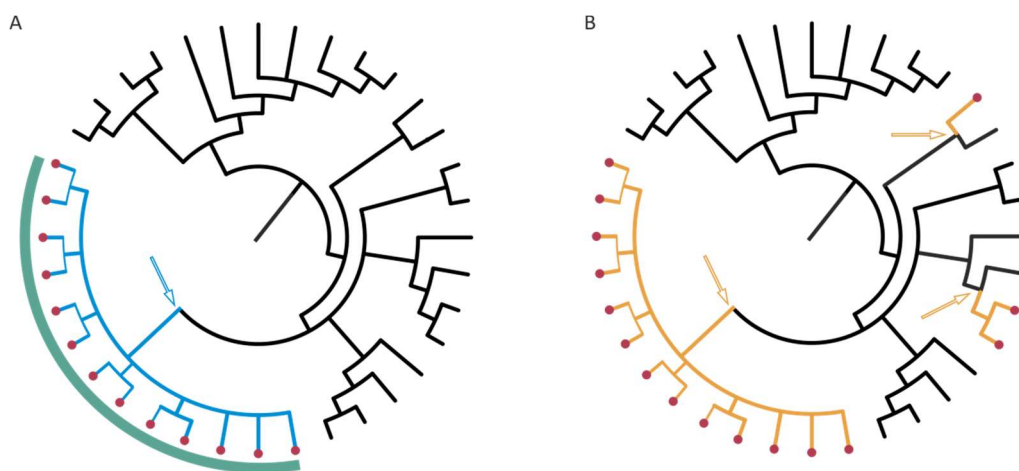


Abbildung 9 | Schematische Darstellung der *population stratification* in GWAS. Rote Punkte kennzeichnen Isolate mit dem Phänotyp von Interesse. Kontrollisolate weisen keinen Punkt auf. (A) Der blaue Pfeil zeigt die Entstehung einer kausalen Mutation, die von einem Vorfahren an alle Nachkommen vererbt wurde (blaue Linien). Eine GWAS würde diesen SNP positiv mit dem Phänotyp von Interesse assoziieren. Gleichmaßen würden alle Mutationen mit dem Phänotyp assoziiert werden, die für die Klade charakteristisch sind (grüner Balken). (B) Entstehung einer kausalen Mutation (gelb), die unabhängig von dem genetischen Hintergrund in drei unterschiedlichen Kladen entstanden ist. Die Mutation sollte einen höheren p -Wert aufweisen.

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation genetischer Varianten, die mit einer Resistenz von *S. aureus* gegenüber DAP und CPT einhergehen. Beide Antibiotika werden gegenwärtig als Reserveantibiotika zur Behandlung schwerwiegender Infektionen eingesetzt, die durch Gram-positive Erreger verursacht werden. Obwohl DAP und CPT eine starke antimikrobielle Aktivität gegenüber *S. aureus* und im Speziellen MRSA zeigen, wurden schon kurz nach Markteinführung der Substanzen entsprechende Resistenzen beobachtet.

Für die Durchführung der Studien galt es, möglichst repräsentative Stammsammlungen von klinischen *S. aureus* Isolaten anhand von Resistenz- und Typisierdaten aufzubauen. Im Zuge dessen sollten kommerzielle und vollautomatisierte Testsysteme zur Bestimmung der DAP-MHK bei *S. aureus* überprüft werden. Folgend sollten die Verwandtschaftsverhältnisse der Isolate auf der Basis von Genomsequenzen rekonstruiert werden. Zu diesem Zweck war der Einsatz von NGS-Verfahren vorgesehen. Unter Berücksichtigung der ermittelten Populationsstrukturen sollten GWAS durchgeführt werden, um genetische Varianten zu detektieren, die signifikant mit der jeweiligen phänotypischen Resistenz assoziiert sind. Dabei sollten die Chancen aber auch die Limitationen der verwendeten Tools beschrieben werden. Zur Bestätigung kausaler Zusammenhänge sollten im Folgenden *S. aureus* Substitutionsmutanten erzeugt und auf ihre Empfindlichkeit gegenüber den jeweiligen Antibiotika getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 | Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Unternehmenssitz
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, USA
Applied Biosystems® 3500 Series (Dx; xL)	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
BioPhotometer Plus	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Concentrator Plus	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Elektrophoresekammer Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA
Elektrophoresekammer Sub-Cell® GT	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA
Elektroporationssystem Gene Pulser® II	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA
Feinwaage Sartorius MSA225P-100-DU Cubis®	Sartorius AG	Göttingen, DE
Fluorometer Qubit® 3.0	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
Geldokumentation GelDoc™ XR+	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA
Inkubationsschüttler Innova® 42	New Brunswick Scientific Co., Inc.	Edison, USA
Kühlzentrifuge Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Kühlzentrifuge Perfect Spin 24 R	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen, DE
Miseq System	Illumina, Inc.	San Diego, USA
Sicherheitswerkbank HERAsafe HS 12	Heraeus Holding GmbH	Hanau, DE
Spannungsgerät Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA
Thermocycler Biometra Tadvanced	Analytic Jena AG	Jena, DE
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Tischzentrifuge Qualitron DW-41-230	Qualitron Corporation	Sindh, PAK
VITEK® 2	bioMérieux, Inc.	Marcy-l'Étoile, FRA
Vortexer IKA Works (Agilent-Chip-Adapter)	IKA Works, Inc.	Wilmington, USA
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, Inc.	Bohemia, USA
Wage Sartorius LP2200S	Sartorius AG	Göttingen, DE
Wärmeschrank HERAcool 40	Heraeus Holding GmbH	Hanau, DE
Wasseraufbereitungssystem Milli-Q® A10	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Wasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel, DE

2.1.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Für eine Vielzahl molekularbiologischer Methoden bezogen wir von unterschiedlichen Herstellern gebrauchsfertige Kits und Materialien. Diese können der Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 2 | Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Unternehmenssitz
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, USA
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
Cryobank™ Kryoröhrchen	Mast Diagnostica GmbH	Reinfeld, DE
DNeasy® Blood & Tissue Kit	QIAGEN GmbH	Hilden, DE
DreamTaq Green PCR Master Mix 2X	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
DreamTaq PCR Master Mix 2X	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
Elektroporationsküvette (2 mm)	VWR International	Radnor, USA
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
McFarland Standard	bioMérieux, Inc.	Marcy-l'Étoile, FRA
MiSeq Reagent Kit v3	Illumina, Inc.	San Diego, USA
Nalgene® Spritzenfilter (0,45 µm)	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
Nextera Index Kit	Illumina, Inc.	San Diego, USA
Nextera XT DNA Library Preparation Kit	Illumina, Inc.	San Diego, USA
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH	San Diego, USA
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
UVette® (50 – 2000 µL)	Eppendorf AG	Hamburg, DE
VITEK® AST P611	bioMérieux, Inc.	Marcy-l'Étoile, FRA

2.1.3 Verwendete Chemikalien

Für die Herstellung von Puffern, Lösungen und Agarosegelen verwendeten wir die in Tabelle 3 aufgeführten Chemikalien. Sofern notwendig, erfolgte die Sterilisation durch Autoklavieren (121 °C für 15 min) oder Sterilfiltration (Nalgene® Spritzenfilter).

Tabelle 3 | Eingesetzte Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Unternehmenssitz
Borsäure (H_3BO_3)	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg, DE
Kalziumchlorid ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Ethanol ROTIPURAN® (EtOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Ethidiumbromid (EtBr; 10 mg/mL)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH	Oldendorf, DE
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
Natrium-EDTA ($\text{Na-EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg, DE
Nukleasefreies Wasser (ddH ₂ O)	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
SYBR® Safe	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg, DE
Triton® X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE

2.1.4 Verwendete Antibiotika

Die in Tabelle 4 aufgeführten Antibiotika wurden zur Empfindlichkeitsüberprüfung genutzt oder als Selektionsmarker in Nährmedien verwendet (vergl. Tabelle 6).

Tabelle 4 | Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Hersteller	Unternehmenssitz
Ceftarolin ¹ (CPT)	ddH ₂ O	AstraZeneca GmbH	Wedel, DE
Chloramphenicol (CHL)	EtOH (96 %)	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, USA
Daptomycin ¹ (DAP)	ddH ₂ O	Cubist Pharmaceuticals, Inc.	Lexington, USA
Erythromycin (ERY)	ddH ₂ O	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, USA
Oxacillin ¹ (OXA)	ddH ₂ O	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, USA
Streptomycin (STR)	ddH ₂ O	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, USA

¹ Antibiotika für die Empfindlichkeitsüberprüfung

2.1.5 Verwendete Epsilometer Teststreifen

Für die komparative Evaluierung von DAP-MHK-Teststreifen bezogen wir gebrauchsfertige Teststreifen von drei Anbietern. Die Produktnamen sowie Herstellerangaben können der Tabelle 5 entnommen werden.

Tabelle 5 | Verwendete MHK-Teststreifen

MHK-Teststreifen	Hersteller	Unternehmenssitz
Daptomycin MIC Test Strip®	Liofilchem® s.r.l.	Roseto degli Abruzzi, ITA
Etest®	bioMérieux, Inc.	Marcy-l'Étoile, FRA
M.I.C. Evaluator®	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA

2.1.6 Verwendete Nährmedien

Die in dieser Arbeit eingesetzten Kulturmedien wurden in dem Labor für Nährmedien des RKI nach Angaben der Hersteller angefertigt. Im Falle der Zubereitung fester Nährmedien wurde den Ansätzen 2 % Agarose hinzugefügt. Im Anschluss an die Sterilisation durch Autoklavieren (15 min, 121 °C) wurden die Medien bei Bedarf mit einem Selektionsantibiotikum (Tabelle 4) ergänzt. Die Tabelle 6 listet alle verwendeten Nährmedien auf.

Tabelle 6 | Eingesetzte Medien

Medium	Hersteller	Unternehmenssitz
B2-Bouillon	Eigenherstellung ^a	Labor für Nährmedien (LfN), Wernigerode, DE
Luria Bertani Agar	Laboratories CONDA S.A.	Torrejón de Ardoza, ESP
Luria Bertani Bouillon	Laboratories CONDA S.A.	Torrejón de Ardoza, ESP
Müller Hinton Agar mit 3 % Schafblut	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
Müller Hinton Bouillon	Becton Dickinson GmbH	Franklin Lakes, USA
SOC-Bouillon	Eigenherstellung ^b	Wernigerode, DE
Tryptic Soy Bouillon	Becton Dickinson GmbH	Franklin Lakes, USA

^a 10 g/L Casaminoäuren, 25 g/L Hefeextrakt, 1 g/L K₂HPO₄, 5 g/L D-Glucose, 25 g/L NaCl

^b 20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ und 20 mM Glucose

2.1.7 Verwendete Lösungen

Für eine Reihe von Anwendungen bieten verschiedene Hersteller gebrauchsfertige Lösungen an. Die in dieser Arbeit bezogenen Lösungen sind in der Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7 | Verwendete gebrauchsfertige Lösungen

Lösung	Konzentration	Hersteller	Unternehmenssitz
CutSmart® Puffer	10X	New England BioLabs GmbH	Frankfurt am Main, DE
DreamTaq PCR Green Master Mix	2X	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
GeneRuler DNA Ladder Mix	0,5 µg/µL	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	0,5 µg/µL	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
Ladepuffer für Agarosegele	6X	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA
Phusion HF Master Mix	2X	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA

Neben den kommerziell erworbenen Lösungen stellten wir Pufferlösungen in Eigenarbeit her. Die Ingredienzen und Konzentrationsangaben können der Tabelle 8 entnommen werden.

Tabelle 8 | Verwendete Pufferlösungen (Eigenherstellung)

Lösung	Substanz	Konzentration
Lysispuffer	Tris/HCl	20 mM
	Natrium EDTA x 2 H ₂ O	2 mM
	Triton® X-100	1,2 %
	Lysostaphin	100 µg/mL
10X Tris-Borat-EDTA Puffer (TBE)	Tris	890 mM
	Natrium EDTA x 2 H ₂ O	20 mM
	Borsäure	890 mM

Im Falle der Färbung von Agarosegelen mittels Ethidiumbromid wurde eine Ethidiumbromid-Färbelösung mit einer Endkonzentration von 1 µg/mL Ethidiumbromid in ddH₂O hergestellt.

2.1.8 Verwendete Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in der Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9 | Verwendete Enzyme

Enzym	Konzentration	Hersteller	Unternehmenssitz
<i>DpnI</i> Endonuklease	20.000 U/mL	New England BioLabs GmbH	Frankfurt am Main, DE
<i>HaeII</i> Endonuklease	20.000 U/mL	New England BioLabs GmbH	Frankfurt am Main, DE
Lysostaphin	500 U/mg Protein	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, USA
RNase	100 mg/mL	QIAGEN GmbH	San Diego, USA

2.1.9 Verwendete Plasmide

Tabelle 10 zeigt eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Die entsprechenden Vektorkarten sind der Abbildung 10A und Abbildung 10B zu entnehmen.

Tabelle 10 | Verwendete Plasmidvektoren

Plasmid	Donor	Größe [kb]	Selektionsmarker
pRB474 [191]	<i>S. aureus</i> SA113	5.920	CHL
pRB474- <i>mprF</i> [121]	<i>S. aureus</i> SA113	8.443	CHL

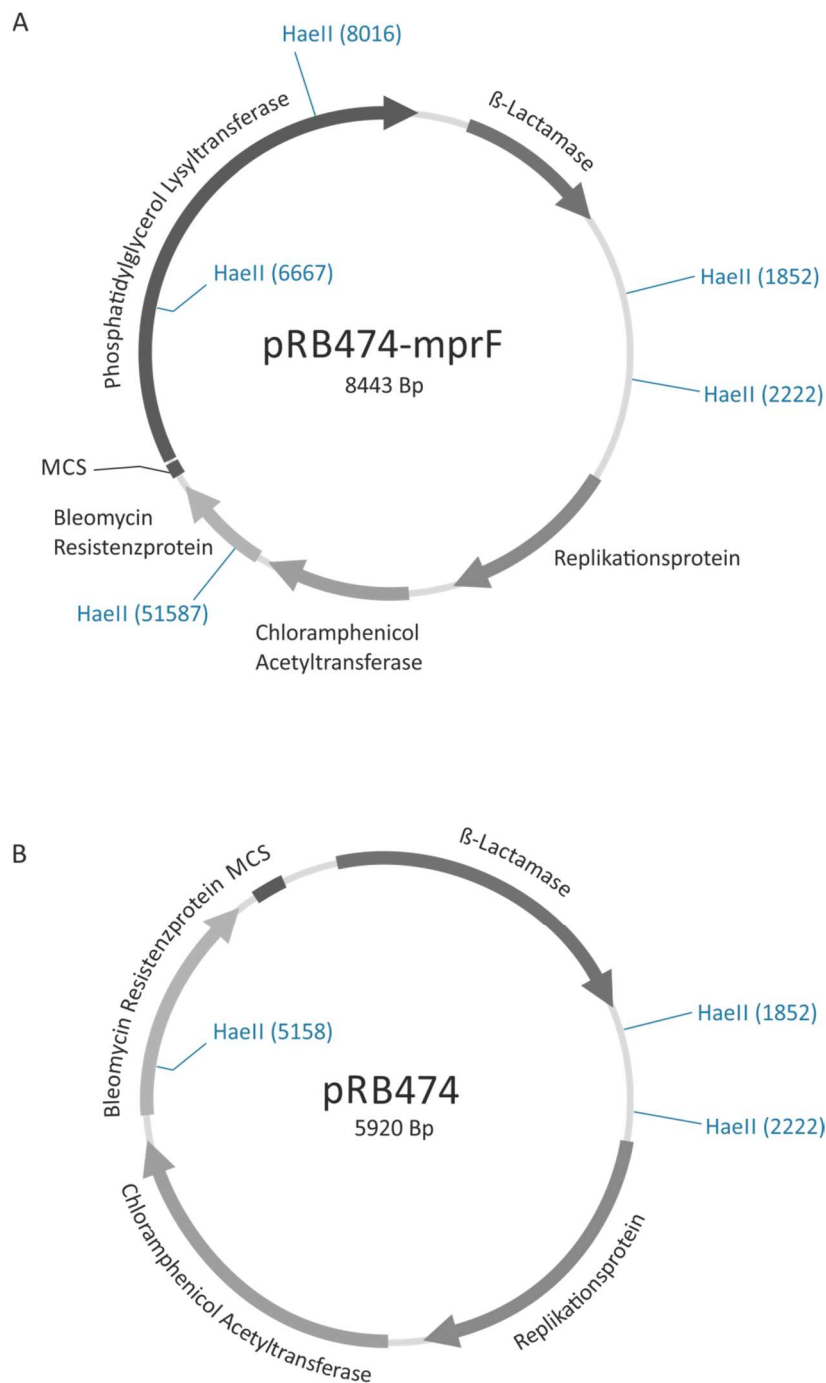


Abbildung 10 | Schematische Abbildung der Plasmidkarten von pRB474-mprF (A) und pRB474 (B). Die Lage und Orientierung der kodierenden Gene wird durch die Anordnung der Pfeile dargestellt. Als Selektionsmarker diente CHL. Die *HaeII* Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. MCS = Mehrfachklonierungsstelle (engl. *multiple cloning site*).

2.1.10 Verwendete Primer

In der Tabelle 11 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgeführt. Die Oligonukleotide wurden mittels Geneious 10.0.5 entworfen und von dem Unternehmen Integrated DNA Technologies bezogen.

Tabelle 11 | Verwendete Primer

Primer-Name	T _A [°C]	Produkt [bp]	Sequenz [5'→ 3']	Zweck
mprF-1_F mprF-4_R	55	3.207	ATGGTGCTTATAATGTTGGGCAG GCAGAAGAACAAAAAATACGCCAAG	Überprüfung <i>mprF</i> in SA113 und SA113Δ <i>mprF</i>
mprF8_pRB_seq1_F mprF8_pRB_seq1_R	51	658	ATTGAACCACCGTTTTCAAC TTTGATGCCTCAAGCTAGAG	Sanger Sequenzierung <i>mprF</i> in pRB474- <i>mprF</i>
mprF8_pRB_seq2_F mprF8_pRB_seq2_R	51	769	CTTGCAGTAATTGATCCCG GCCCACCACCAATAAATAG	Sanger Sequenzierung <i>mprF</i> in pRB474- <i>mprF</i>
mprF8_pRB_seq1_F mprF8_pRB_seq2_R	51	3.219	ATTGAACCACCGTTTTCAAC GCCCCACCACCAATAAATAG	Amplifikation <i>mprF</i> in pRB474- <i>mprF</i>
pRBmprF_A315T_F pRBmprF_A315T_R	55	8.443	CTAAATACTTTATTCTACTAAAGATGTTAC GTCATTTTAAATGTCTTATCAAAAGG CCTTTTGATAAGACATTAAAAATGACGTAA CATCTTTAGTAGGAATAAAGTATTTAG	Mutagenese-Primer für <i>mprF</i> A315T in pRB474- <i>mprF</i>
pRBmprF_D317N_F pRBmprF_D317N_R	55	8.443	CTAAATACTTTATTCTGCTAAAAATGTTAC GTCATTTTAAATGTCTTATCAAAAGG CCTTTTGATAAGACATTAAAAATGACGTAA CATTTTGTAGCAGGAATAAAGTATTTAG	Mutagenese-Primer für <i>mprF</i> D317N in pRB474- <i>mprF</i>
pRBmprF_L431F_F pRBmprF_L431F_R	55	8.443	GGTAGCTATTATTTTGTCTGTTTATTGT AGCTTCCGTAGAGCACG CGTGCTCTACGGAAGCTACAATAAACAG AACAAAAATAATAGCTAACC	Mutagenese-Primer für <i>mprF</i> L431F in pRB474- <i>mprF</i>
pRBmprF_P314L_F pRBmprF_P314L_R	55	8.443	CCTTTTGATAAGACATTAAAAATGACGTAA CATCTTTAGCAAGAATAAAGTATTTAG CTAAATACTTTATTCTTGCTAAAGATGTTAC GTCATTTTAAATGTCTTATCAAAAGG	Mutagenese-Primer für <i>mprF</i> P314L in pRB474- <i>mprF</i>
pRBmprF_P314LA315T_F pRBmprF_P314LA315T_R	55	8.443	GATCTAAATACTTTATTCTTACTAAAGATGT TACGTCATTTTAAATGTCTTATCAAAAGG CCTTTTGATAAGACATTAAAAATGACGTAA CATCTTTAGTAAGAATAAAGTATTTAGATC	Mutagenese-Primer für <i>mprF</i> P314L/A315T in pRB474- <i>mprF</i>
pRBmprF_T345A_F pRBmprF_T345A_R	55	8.443	CATTAGCAATTTTAGTATTCTTTGCAAGTAT GATCTTTTTGTAAATAACTTAACGATTG CAATCGTTAAGTTATTTACAAAAAAGATCA TACTTGCAAAGAATACTAAAATTGCTAATG	Mutagenese-Primer für <i>mprF</i> T345A in pRB474- <i>mprF</i>

Primer-Name	T _A [°C]	Produkt [bp]	Sequenz [5'→ 3']	Zweck
pRBmprF_T472K_F	55	8.443	GTTAACCATATATTTATTGCTGGAAAGTTA TATGCATTAGATATTTATACGATTGAAATG	Mutagenese-Primer für <i>mprF</i> T472K in pRB474- <i>mprF</i>
pRBmprF_T472K_R			CATTTCAATCGTATAAATATCTAATGCATAT AACTTTCCAGCAATAAATATATGGTTAAC	
pRBmprF_W424R_F	55	8.443	GCTTCATATATTTTAATAACACGGTTAGCT ATTATTTTGTCTGCTTATTGTAG	Mutagenese-Primer für <i>mprF</i> W424R in pRB474- <i>mprF</i>
pRBmprF_W424R_R			CTACAATAAGCAGAACAAAAATAATAGCT AACCGTGTATTAAAAATATATGAAGC	
RW_mprF1-F	51	762	AAGAAGCACTCATAATCGGC	Sanger Sequenzierung <i>mprF</i> in pRB474- <i>mprF</i>
RW_mprF1-R			ACCCATCTTACCCATGTAATC	
RW_mprF2-F	51	700	TGTAGCAATCACATTGTATCG	Sanger Sequenzierung <i>mprF</i> in pRB474- <i>mprF</i>
RW_mprF2-R			TACAACATAAATCGAAAGCGC	
RW_mprF3-F	51	734	TCAATGTTGACAGGTTTAAGC	Sanger Sequenzierung <i>mprF</i> in pRB474- <i>mprF</i> , Kolonie-PCR <i>E. coli</i>
RW_mprF3-R			CAAGCACTAGTATGAATTGCC	
RW_mprF4-F	51	711	GGCAATTCATACTAGTGCTTG	Sanger Sequenzierung <i>mprF</i> in pRB474- <i>mprF</i>
RW_mprF4-R			GGCATGTGTTGATCTGTAAC	
RW_mprF5-F	51	774	ATGCATACATCTGTATTGCG	Sanger Sequenzierung <i>mprF</i> in pRB474- <i>mprF</i>
RW_mprF5-R			ATCTAACTCTGGCAACCATC	
RW_mprF6-F	51	714	TCGAAATTATTGAACCACCG	Sanger Sequenzierung <i>mprF</i> in pRB474- <i>mprF</i>
RW_mprF6-R			AGGCGACTTAACCTTAGCTC	

2.1.11 Verwendete Software

Die Tabelle 12 enthält die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Softwareprogramme und Tools.

Tabelle 12 | Verwendete Software und Tools

Software/Tool	Version	Entwickler/Referenz
2100 Expert Software	B.02.08.SI648 (SR2)	Agilent Technologies, Inc.
A5-miseq	20150522	Coil, D. <i>et al.</i> 2015 [192]
BatchAssembly	0.0.9 (DAP-Studie) 1.1.0 (CPT-Studie)	Fuchs S.
BWA-SW	0.7.13-r1126 (DAP-Studie, <i>Seqrec</i>) 0.7.15-r1140 (CPT-Studie, <i>batchMap</i>) 0.7.12-r1039 (DAP-Studie, <i>refRank</i>) 0.7.10-r789 (CPT-Studie, <i>refRank</i>)	Li, H. und Durbin, R. 2010 [193]
Corel	16.2.0.998	Corel Corporation
eBurst	3	Feil, E.J. <i>et al.</i> 2004 [194]
EmEditor	7.5.0	Emurasoft, Inc.
FastQC	0.11.2 (DAP-Studie) 0.11.5 (CPT-Studie)	Babraham Bioinformatics Group github.com/s-andrews/FastQC
Geneious®	10.0.5.0	Biomatters Ltd.
GraphPad Prism	7.301	GraphPad Software, Inc.
Haploview	4.2	Barett, J.C. <i>et al.</i> 2005 [195]
hierBAPS	Update 15.08.2013	Cheng, L. <i>et al.</i> 2013 [196]
Image Lab™	6.0	Bio-Rad Laboratories, Inc.
iTOL	4.1.1	Letunic, I. und Bork, P. https://itol.embl.de/
Mafft	7.205	Kuraku, S. <i>et al.</i> , 2013 [197]
Mauve (Geneious Tool)	2.3.1	Darling <i>et al.</i> 2004 [198]
Mesquite	3.04	Maddison, W.P. und Maddison, D.R. 2018 [199]
Notepad++	7.5.1.0.0	Don, H. notepad-plus-plus.org
Phandango	1.1.0	Hadfield, J. <i>et al.</i> , 2017 [200]
PLINK	1.90b3.31	Chang, C.C. <i>et al.</i> 2015 [201]
Primer3 (Geneious Tool)	2.3.7	Rozen <i>et al.</i> 2000 [202]
PrimerX	Update 14.08.2006	Lapid, C. und Gao, Y. bioinformatics.org/primerx/
qqman	0.1.4	Turner, S.D. 2014 [203]
R	3.4.1	Ihaka, R., Gentleman, R.
RAST Server	2.0	Aziz, R. A. <i>et al.</i> 2008 [204]

Software/Tool	Version	Entwickler/Referenz
RStudio	1.0.44	RStudio, Inc.
SAMtools	1.3.1 (<i>refRank</i> , <i>batchMap</i>) 0.1.2 (<i>Seqrec</i>)	Li, H. <i>et al.</i> , 2009 [205]
SCCmecFinder	1.2	Kaya, H. <i>et al.</i> 2018 [206]
SEER	1.4.1	Lees, J.A. <i>et al.</i> 2016 [176]
SeqSphere	4.1.9	Ridom GmbH
SIFT	-	Ng, P.C. und Henikoff, S. 2001 [207]
SnapGne®	4.1.6	GSL Biotech LLC
snpFilter	2.2.0 (DAP-Studie) 3.0.0 (CPT-Studie)	Fuchs, S. [208]
Trimmomatic	0.32 (DAP-Studie) 0.36 (CPT-Studie)	Bolger, A.M. <i>et al.</i> 2014 [209]
VarScan	2.3	Koboldt <i>et al.</i> 2012 [210]

Für einige Prozesse wurden *in house* Software-Pipelines entwickelt, um eine automatisierte Verarbeitung von Daten zu ermöglichen. Die in den Pipelines integrierten Tools können der Tabelle 13 entnommen werden.

Tabelle 13 | Verwendete *in house* Software Pipelines

Software Pipeline	Version	Integrierte Tools ²	Entwickler/Referenz
BatchMap	1.2.0	Trimmomatic BWA-SW SAMtools VarScan Mafft	Fuchs S. [211]
refRank	0.0.9 (DAP-Studie) 3.0.0 (CPT-Studie)	BWA-SW SAMtools	Fuchs S. [208]
Seqrec	-	BWA-SW SAMtools VarScan	Steglich, M.

² vergl. Tabelle 12

2.1.12 Bakterielle Isolate

2.1.12.1 Bakterielle Isolate für die Evaluierung kommerzieller Testsystemen zur Bestimmung der DAP Empfindlichkeit

Für die komparative Evaluierung von kommerziellen Testsystemen zur Bestimmung der DAP-Empfindlichkeit bei *S. aureus* wählten wir 86 DAP-unempfindliche (DAP-R) *S. aureus* Isolate entsprechend ihres klonalen Hintergrunds (CC bzw. ST), des Isolationsdatums und der geographischen Herkunft aus. Folgend ergänzten wir die Sammlung um 21 DAP-empfindliche (DAP-S) Isolate mit ähnlichen Eigenschaften. Die finale Stammsammlung umfasste 107 *S. aureus* Isolate aus 6 CCs (CC 1, CC 5, CC 8, CC 22, CC 30, CC 45) und 8 STs ohne CC-Zugehörigkeit (ST 7, ST 15, ST 45, ST 78, ST 101, ST 225, ST 239, ST 398), darunter sowohl phänotypisch Methicillin-sensible (MSSA, MHK OXA ≤ 2 mg/L, $n = 47$), als auch Methicillin-resistente Isolate (MRSA, MHK OXA > 2 mg/L, $n = 60$). Detaillierte Informationen zu der Stammsammlung können Weber R. *et al.*, 2017 [212] und dem Anhang 1 entnommen werden.

2.1.12.2 Bakterielle Isolate für die Identifizierung DAP-R assoziierter SNPs

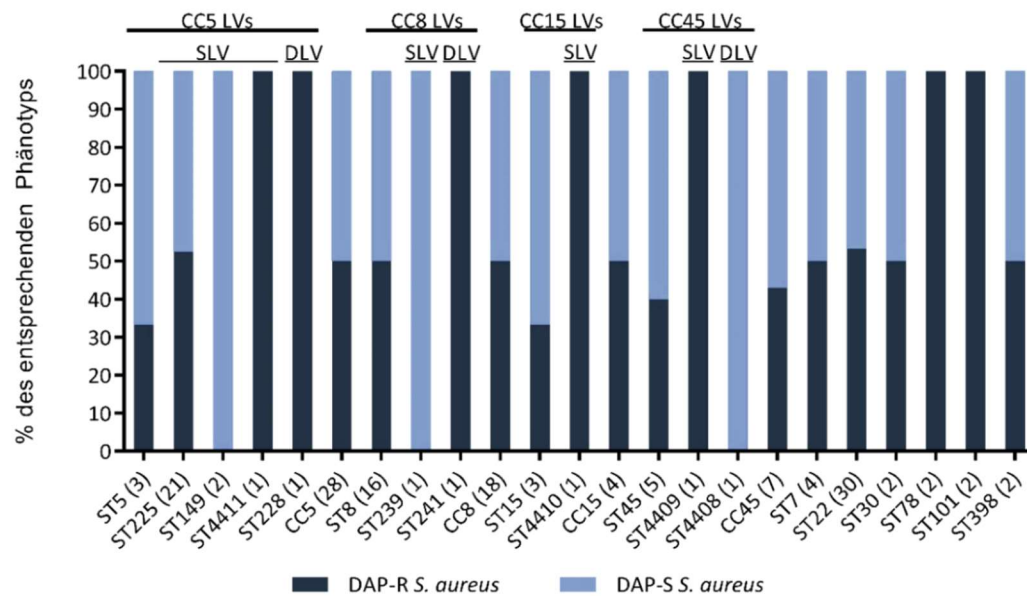
Für die Identifizierung von SNPs, die mit einer verminderten DAP-Empfindlichkeit in *S. aureus* assoziiert sind, griffen wir auf 52 klinische DAP-R *S. aureus* Isolate der im vorherigen Abschnitt (2.1.12.1) beschriebenen Stammsammlung zurück. Diese ergänzten wir mit 47 DAP-S *S. aureus* Isolaten, die ähnliche Eigenschaften hinsichtlich des klonalen Hintergrundes, des Isolationsdatums und der geographischen Herkunft aufwiesen. Die finale Stammsammlung umfasste 99 *S. aureus* Isolate aus 4 CCs und 19 STs: CC 5 (einschließlich ST 5, ST 225, ST 149, ST 4411 und ST 228), CC 8 (einschließlich ST 8, ST 239 und ST 241), CC 15 (einschließlich ST 15 und ST 4410), CC 45 (einschließlich ST 45, ST 4409 und ST 4408), ST 7, ST 22, ST 30, ST 78, ST 101 und ST 398 (vergl. Abbildung 11), darunter sowohl MSSA ($n = 38$), als auch MRSA Isolate ($n = 61$). Im Anhang 2 sind detaillierte Informationen bezüglich der Stammsammlung aufgelistet. Im Folgenden werden wir diese Bakterienkollektion als DAP-Stammsammlung bezeichnen.

2.1.12.3 Bakterielle Isolate für die Identifizierung CPT-R assoziierter SNPs

Für die Durchführung von Assoziationsstudien zur Identifizierung von SNPs, die mit einer CPT-Resistenz assoziiert sind, wählten wir 44 CPT-unempfindliche (CPT-R) und 43 CPT-empfindliche (CPT-S) *S. aureus* Isolate hinsichtlich der zugeordneten klonalen Hintergründe aus. Die finale Stammsammlung umfasste Isolate der klonalen Linien CC 5 (einschließlich ST 5, ST 225, ST 146, ST 228, ST 111 und einen unbekannten ST), CC 8 (einschließlich ST 8, ST 113, ST 239, ST 14407 und ST 1465), CC 22 (einschließlich ST 22 und ST 4406), ST 30 und ST 398 (vergl. Abbildung 11). Detaillierte Informationen zu der Stammsammlung

können dem Anhang 3 entnommen werden. Im Folgenden werden wir diese Bakterienkollektion als CPT-Stammsammlung bezeichnen.

A



B

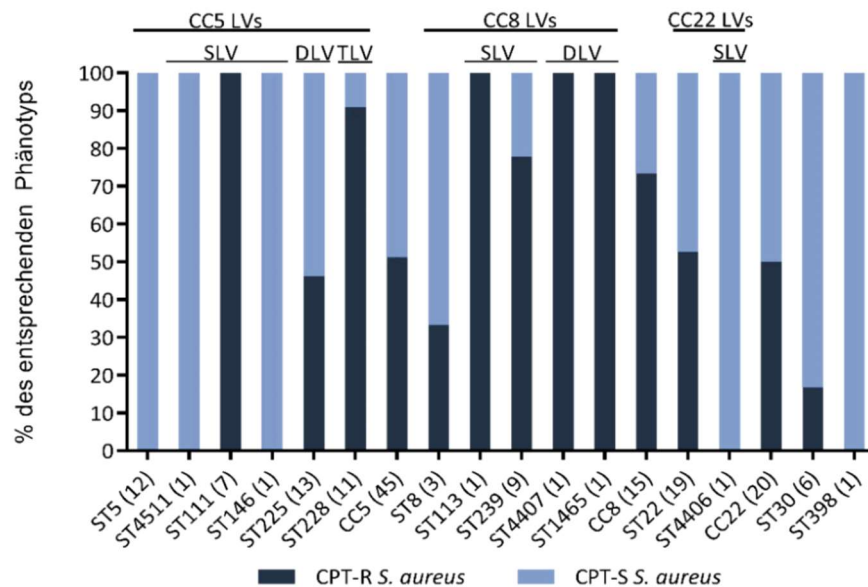


Abbildung 11 | Verteilung der Antibiotika-resistenten und -empfindlichen Stämme innerhalb der STs bzw. CCs der (A) DAP- und (B) CPT-Stammsammlung. Die Anzahl der *S. aureus* Isolate der entsprechenden phylogenetischen Gruppe sind entlang der x-Achse in Klammern angegeben. CC = Klonaler Complex (engl. *clonal complex*), LV = Lokusvariante (engl. *locus variant*), SLV = Einzellokus-Variante (engl. *single locus variant*), DLV = Doppellokus-Variante (engl. *double locus variant*).

2.1.12.4 Bakterielle Isolate für die Etablierung von *S. aureus* Substitutionsmutanten

Für die Konstruktion von *S. aureus* Mutanten nutzten wir die in Tabelle 14 aufgeführten Stämme.

Tabelle 14 | Verwendete bakterielle Isolate

Bezeichnung	Spezies	Selektionsmarker	Referenz
IM08B	<i>E. coli</i>	ERY	Monk I.R. <i>et al.</i> , 2015 [213]
SA113 (ATCC® 35556 TM)	<i>S. aureus</i>	keiner	Iordanescu S. und Surdeanu M., 1976 [214]
SA113Δ <i>mprF</i>	<i>S. aureus</i>	ST R	Peschel A. <i>et al.</i> , 2001 [215]
SA113Δ <i>mprF</i> pRB474	<i>S. aureus</i>	ST R/CHL	Peschel AG, Tübingen (unpubliziert)
SA113Δ <i>mprF</i> pRB474- <i>mprF</i>	<i>S. aureus</i>	ST R/CHL	Peschel AG, Tübingen (unpubliziert)

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung und Archivierung von *S. aureus*

2.2.1.1 Kultivierung

Soweit nicht anders beschrieben, wurden *S. aureus* Stämme auf Müller-Hinton Agarplatten mit 3 % Schafblut (Oxoid™) und *E. coli* Stämme auf LB-Agarplatten kultiviert. Im Falle plasmidtragender *E. coli* bzw. *S. aureus* Isolate verwendeten wir LB- bzw. TSB-Selektionsplatten mit einem entsprechenden Antibiotikum (vergl. 2.1.4 und 2.1.9). Die Vereinzelnung der Bakterien erfolgte unter der Sterilwerkbank und die Inkubation der Platten bei 37 °C über Nacht. Sofern die Bakterien nicht unmittelbar benötigt wurden, erfolgte die kurzzeitige Lagerung bei 4 °C.

2.2.1.2 Kryokonservierung

Zur Konservierung und Archivierung von Bakterien nutzten wir Cryobank™ Kryoröhrchen von Mast Diagnostica GmbH. Die Röhrchen wurden nach Angaben des Herstellers mit 2 – 3 Kolonien einer frischen Reinkultur beimpft (McFarland 3 – 4) und das Kryomedium abgesaugt. Die Lagerung der Kulturen erfolgte bei -80 °C. Für die Reinkultivierung der Isolate wurden einzelne Kügelchen auf entsprechendem Agarmedium ausgestrichen und unter geeigneten Kultivierungsbedingungen inkubiert.

2.2.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

2.2.2.1 Mikrobouillon Dilutionsverfahren

Das Mikrobouillondilutionsverfahren (MBV) ist ein standardisiertes Verfahren zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) antimikrobieller Substanzen. Die MHK entspricht dabei der niedrigsten Konzentration eines Antibiotikums, bei dem nach 18- bis 24-stündiger Inkubation kein Wachstum des Bakterienstammes mehr als Trübung des Nährmediums makroskopisch festgestellt werden kann. Im Rahmen der *in vitro* Empfindlichkeitsüberprüfung von *S. aureus* Isolaten gegenüber DAP, CPT und OXA richteten wir uns nach den Vorgaben von EUCAST v. 6.0 [216]. Für die Bestimmung der DAP-MHK wurde Kationen-adjustierte MH-Bouillon (Becton Dickinson GmbH) mit Kalzium (Ca^{2+}) supplementiert, um eine physiologische Ca^{2+} -Konzentration von 50 mg/L zu erreichen [217]. Zur Bestimmung der entsprechenden MHKs nutzten wir Mikrotiterplatten mit geometrischen Verdünnungsreihen (zur Basis 2). Dabei erfolgte die Erfassung der MHKs in einem Bereich von 0,016 – 16 µg/mL für DAP und CPT, bzw. 1 - 1024 µg/mL für OXA. Die Konzentration des Inokulums betrug ca. 5×10^5 CFU/mL. Im Anschluss an die Inkubation der Mikrotiterplatten bei 37 °C für 18 – 24 Stunden erfolgte die Ablesung und Interpretation der MHKs auf Grundlage der bei EUCAST angegebenen klinischen MHK-Grenzwerte (v6.0 2016). Als Kontrollstamm verwendeten wir *S. aureus* ATCC29213.

2.2.2.2 Epsilometer Test

Neben dem MBV gelten kommerziell erhältlich MHK-Teststreifen als verlässliche Methode zur Bestimmung von MHKs. Die MHK-Teststreifen enthalten einen definierten Konzentrationsgradienten einer antibiotischen Substanz, welche bei Kontakt mit einem Nährboden in diesen diffundiert. Zur Überprüfung der Verlässlichkeit von MHK-Teststreifen, den DAP-Phänotyp von *S. aureus* Stämmen zu bestimmen, bezogen wir von folgenden Herstellern entsprechende MHK-Teststreifen: bioMérieux (Etest®), Thermo Fisher Scientific (M.I.C.Evaluator®) und Liofilchem (Daptomycin MIC test strip®). Die MHK-Testung führten wir auf Kationen-adjustierten Mueller-Hinton Agar entsprechend den Anweisungen des Herstellers durch. Als Kontrollstamm verwendeten wir *S. aureus* ATCC29213. Zum Zweck der komparativen Analyse wurden die ermittelten MHKs zur nächst höheren \log_2 Verdünnung aufgerundet.

2.2.2.3 VITEK

Zur automatisierten Bestimmung des Resistenzspektrums von *S. aureus* Isolaten nutzten wir das VITEK® 2 System (bioMérieux, Inc.) mit der VITEK-Resistenzkarte AST-P611 nach Angaben des Herstellers. Die Arbeitsschritte beschränkten sich auf die Kultivierung von *S. aureus* Isolaten (2.2.1.1) und die Herstellung eines standardisierten Inokulums (*S. aureus* Kolonien in 3 mL 0,5 % NaCl Lösung, McFarland 0,5 – 0,63)). Anschließend erfolgte die vollautomatisierte Inkubation und das Ablesen der gebrauchsfertigen Einweg-Testkarten.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Allgemeine Methoden

2.2.3.1.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung, Darstellung und Größenbestimmung von Nukleinsäuren. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatreste der DNA wandern die DNA-Moleküle bei angelegter Spannung in Richtung der Anode. Da die negative Ladung eines linearen DNA-Moleküls direkt proportional zur Kettenlänge ist, werden die Nukleinsäuren in Abhängigkeit ihrer Größe aufgetrennt. Dabei hängt die Auftrennungsfähigkeit maßgeblich von der Konzentration der Agarose im Gel ab. Je nach Größe des zu erwartenden Produktes erfolgte die Auftrennung in einem 1 bis 1,5-prozentigen (w/v) Agarosegel. Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge Ultra-Pure Agarose (Invitrogen AG) in 1X Tris-Borat-EDTA Puffer (TBE, Eigenherstellung) gelöst. Zur Färbung der DNA nutzten wir den DNA-interkalierende Farbstoff SYBR® Safe (Invitrogen AG), welcher der flüssigen Agarose beigefügt wurde. Dabei wurde die Stammlösung, abweichend vom Herstellerprotokoll in einem Verhältnis von 1:20.000 eingesetzt. Im Falle der Auftrennung eines Restriktionsverdaus nutzten wir EtBr zur Färbung der

Agarosegele (vergl. 2.1.7). Für die Gele setzten wir in der Regel eine Spannung von 5 V/cm an, bis der Farbstoff des Ladepuffers den unteren Gelrand erreichte. Die Gelbanden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht (GelDoc™ XR+, Bio-Rad Laboratories, Inc.) und mittels Image Lab™ 6.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) digital dokumentiert.

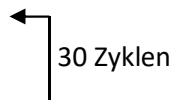
2.2.3.1.2 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur *in vitro* Amplifikation von Zielsequenzen oder Zielgenen genutzt. Als Untersuchungsmaterial diente DNA (siehe 2.2.3.1, 2.2.3.2.2). Für alle PCR-Reaktionen verwendeten wir den *ready to use* DreamTaq PCR Green Master Mix von Thermo Fisher Scientific. Dieser enthält im Reaktionspuffer bereits 0,05 U/μL DNA-Polymerase, 4 mM MgCl₂, 0,4 mM jedes dNTPs und DreamTaq Green Puffer. Das Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes betrug 50 μL. Jeder Reaktionsansatz enthielt neben dem Puffer die entsprechenden Forward- und Reverse-Primer, ddH₂O und Template DNA (siehe unten). In der Tabelle 11 finden sich detaillierte Angaben zu den verwendeten Primern. Die PCR-Bedingungen richteten sich nach der Annealing-Temperatur der Primer und der Länge des zu erwartenden Amplifikates. Zur Überprüfung der Anreicherung des Amplifikates wurde das PCR-Produkt mittels einer Agarosegelelektrophorese (2.2.3.1.1) aufgetrennt und die Banden mit SYBR® Safe (Invitrogen AG) im GelDoc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) visualisiert und mittels Image Lab™ 6.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) digital dokumentiert.

Exemplarische Darstellung eines PCR-Ansatzes:

DreamTaq Green Master Mix 2X	24 μL
Forward Primer (10 μM)	0,5 μL
Reverse Primer (10 μM)	0,5 μL
ddH ₂ O	24 μL
DNA	1 μL (entspricht ca. 30 ng)

Standard PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung	98 °C	120 sec.	
Denaturierung	98 °C	30 sec.	
Annealing	T _A	30 sec.	
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	420 sec.	
Kühlung	4 °C	∞	

2.2.3.2 Methoden zur DNA Präparation

2.2.3.2.1 Isolation genomischer DNA

Die genomische DNA (gDNA) von *S. aureus* und *E. coli* Bakterien wurde ausgehend von einer Übernachtskultur in Tryptic Soy Bouillon (TSB; Becton Dickinson GmbH) bzw. LB-Medium (engl. *lysogeny broth*, Laboratories CONDA S.A.) mittels des DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN GmbH) nach Angaben des Herstellers isoliert. Im Falle der Isolation von gDNA aus *S. aureus* erfolgte die enzymatische Lyse der Bakterien in Lysispuffer mit 100 µg/ml Lysostaphin (Sigma-Aldrich Co.). Für den Verdau von RNA-Kontaminationen fügten wir dem Lysispuffer zusätzlich RNase (QIAGEN GmbH; Verhältnis 1:50) hinzu. Die Elution der DNA erfolgte, abweichend vom Herstellerprotokoll, mittels ddH₂O. Im Anschluss an die Isolation der DNA wurde die Reinheit und Konzentration mittels des Eppendorf BioPhotometers (Eppendorf AG) bestimmt.

2.2.3.2.2 Isolation plasmidaler DNA

Für die Isolation plasmidaler DNA (pDNA) nutzten wir das GeneJET Plasmid Miniprep Kit von Thermo Fisher Scientific nach Angaben des Herstellers. Die dem Kit beiliegenden Säulen weisen eine Ladekapazität von 20 µg pDNA auf. Im Falle der Isolation von Plasmiden aus *S. aureus* wurde die Übernachtskultur, abweichend vom Herstellerprotokoll, in TSB (Becton Dickinson GmbH) angesetzt. Zusätzlich wurde die Resuspensionslösung mit 300 µg/mL Lysostaphin (Sigma-Aldrich Co.) supplementiert, um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten (Inkubation für 1 h bei 37 °C). Die Elution der pDNA erfolgte durch die Zugabe von Elutionspuffer. Die Plasmid-Reinheit und -Konzentration bestimmten wir am Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf AG). Bei Bedarf wurde die Flüssigkeit mittels des Concentrators plus (Eppendorf AG) auf das gewünschte Volumen reduziert.

2.2.3.3 Methoden zur Sequenzierung

2.2.3.3.1 Sanger-Sequenzierung


Die Sanger-Sequenzierung ist eine enzymatische Methode der DNA-Sequenzierung und beruht auf der Detektion von fluoreszenzmarkierten kettenabbrechenden Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs). Im Laufe der Replikation eines Templates werden die ddNTPs in den wachsenden Synthesestrang eingebaut und führen zum Abbruch der Elongation [218]. Die resultierenden Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillargelelektrophorese in Abhängigkeit ihrer Größe aufgetrennt und mit einem Laser zur Fluoreszenz angeregt. Die emittierten Fluoreszenzsignale werden von einer CCD-Kamera detektiert und zur Generierung eines Elektropherogramms genutzt, das die direkte Basenabfolge der sequenzierten Vorlage wiedergibt. Als Untersuchungsmaterial dienten PCR-Produkte (2.2.3.1.1), die mit dem QIAquick

PCR Purification Kit (QUIAGEN GmbH) gereinigt wurden. Für die Sequenzierreaktionen nutzten wir das BigDye® v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) nach den Angaben des Herstellers. Da sowohl in Vorwärts- sowie Rückwärtsrichtung sequenziert wurde, stellten wir zwei Ansätze mit den entsprechenden Forward- bzw. Reverse-Primern her (siehe unten). Für die Kapillargelelektrophorese nutzten wir die Applied Biosystems® 3500 Serie (Dx bzw. xL) von Thermo Fisher Scientific. Detaillierte Informationen zu den Primern sind der Tabelle 11 zu entnehmen.

Exemplarische Darstellung eines Sequenzieransatzes:

BigDye® Reagenz	1 µL
Forward- bzw. Reverse-Primer (10 µM)	2 µL
ddH ₂ O	6 µL
DNA	20 ng

Exemplarische Darstellung der Cycle-Sequenzierung:

Initiale Denaturierung	96 °C	120 sec.	 25 Zyklen
Denaturierung	96 °C	10 sec.	
Annealing	T _A	5 sec.	
Elongation	60 °C	240 sec.	
Kühlung	4 °C	∞	

2.2.3.3.2 Illumina Ganzgenomsequenzierung

Die Illumina-Sequenzierung ist eine Sequenziermethode der zweiten Generation. Dabei katalysieren DNA-Polymerasen den Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) in einen Templatestrang, welche während der Syntheszyklen durch Fluorophoranregung bestimmt werden. Da dieser Prozess in Echtzeit abläuft, nennt man ein solches Verfahren auch *sequencing by synthesis*. Der Arbeitsablauf einer Illumina Sequenzierung gliedert sich im Wesentlichen in drei Schritte. Initial wird die DNA der Proben randomisiert fragmentiert und über spezifische Adaptoren kovalent an die *flow cell* gebunden. Anschließend wird jedes dieser Fragmente über eine sogenannte *bridge amplification* zu einem Cluster identischer Sequenzen amplifiziert. In der nachfolgenden Sequenzierreaktion kommen fluoreszenzmarkierte dNTPs zum Einsatz, die gleichzeitig als reversible 3'-Terminatoren agieren und somit den Einbau weiterer Nukleotide verhindern. Infolgedessen wird ein einzelnes Fluoreszenzsignal pro Cluster und Sequenzierzyklus detektiert. Im Anschluss an die Abspaltung der Terminatorgruppen folgen weitere Sequenzierzyklen bis eine Länge von „n“ Basen erreicht ist. In dieser Arbeit nutzten wir die sogenannte *paired-end* Sequenzierung, welche es erlaubt, zwei Enden eines DNA-Fragments zu sequenzieren. Da auf den Abstand zwischen den gepaarten, sequenzierten DNA Fragmenten (Reads) auf Basis der Fragmentgröße zurückgeschlossen werden kann, können Rekombinationsereignisse, repetitive Elemente und Indels effektiver detektiert werden.

2.2.3.3.3 Bibliotheken-Generierung für die MiSeq Ganzgenomsequenzierung

Ausgehend von einer *S. aureus* Übernachtskultur wurde die genomische DNA isoliert (2.2.3.1). Anschließend bestimmten wir die Reinheit und Konzentration der Nukleinsäuren mittels des Eppendorf BioPhotometers (Eppendorf AG) bzw. des Qubit® 3.0 Fluorometers (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Die Bibliotheken für die Sequenzierung wurden unter Zuhilfenahme des Nextera XT DNA Library Preparation Kits (Illumina, Inc.) nach Angaben des Herstellers generiert. Zur anschließenden Qualitätskontrolle, Größenbestimmung und Quantifizierung der fragmentierten DNA nutzten wir den hochsensitiven DNA Chip von Agilent Technologies. Dieser wurde nach Herstellerangaben mit den Proben beladen und im Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.) mittels der 2100 Expert Software (Agilent Technologies, Inc.) ausgelesen.

2.2.3.3.4 MiSeq Ganzgenomsequenzierung und Qualitätskontrolle

Die *paired-end* Ganzgenomsequenzierung aller Isolate erfolgte auf dem MiSeq System (Illumina, Inc.) mit dem MiSeq Reagenzien-Kit v3 (Illumina, Inc.). Pro Isolat wurden ca. 1500 pg fragmentierter DNA eingesetzt. Die Qualität der generierten Rohdaten wurde mittels FastQC (Babraham Bioinformatics) überprüft und Reads mit unzureichender Qualität oder zu geringer Lesereichweite mittels Trimmomatic entfernt bzw. gekürzt [209]. Dabei unterschieden sich die Trimming Parameter basierend auf den nachfolgenden Prozessen: für das Read-Alignment (Read-Mapping) wurden die Trimming-Parameter Illuminaclip off (CPT-Projekt: on, NexteraPE-PE.fa), Slidingwindow 4:15, Leading/Trailing 3, Crop off, Headcrop off, Minlen 36 (CPT-Projekt: 50), Avgqual off gewählt, während wir für die *de novo* Assemblierung Maxinfo 50:0.8 verwendeten (ersetzt Slidingwindow). Die Qualität der getrimmten Reads wurde erneut mit FastQC überprüft.

2.2.3.4 Methoden zur Mutagenese von *S. aureus*

Für die genetische Manipulation von *S. aureus* nutzten wir die in Abbildung 12 dargestellte Vorgehensweise. Als Grundlage für die Versuchsreihe diente das Plasmid pRB474-*mprF* und der *S. aureus* Stamm SA113Δ*mprF*, welche wir von der Peschel AG aus Tübingen erhielten. Um das Restriktions-Modifikationssystem (R/M-System) von *S. aureus* zu umgehen, transformierten wir das Mutagenese-Produkt in den Zwischenwirt *E. coli* IM08B, welcher die *hsdMS*-Gene von *S. aureus* enthält, die für die Methylase- und Spezifitätsgene (CC 8) kodieren. Die aus IM08B isolierten Plasmide können daher mit hoher Effizienz in *S. aureus* Stämme transformiert werden, die dem CC 8 angehören, darunter SA113 (ST 8). Alle angewandten Methoden werden in den folgenden Punkten beschrieben.

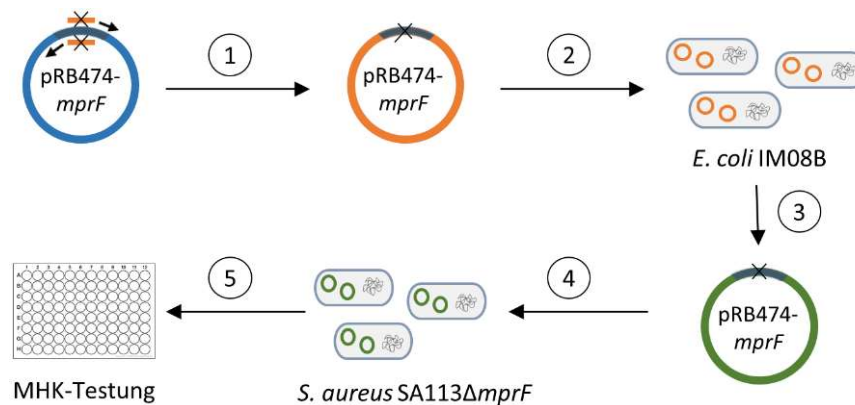


Abbildung 12 | Schematische Darstellung der Mutagenese von *S. aureus*. Im Anschluss an die Herstellung von Mutagenese-Primern erfolgte die (1) ortsspezifische Mutagenese zur Erzeugung von *mprF* Mutationen in *pRB474-mprF*. Anschließend erfolgte der Verdau der parentalen DNA durch *DpnI*. Das Mutagenes-Produkt wurde (2) mittels Hitzeschock in chemokompetente *E. coli* IM08B transformiert und Transformanten über CHL und ERY selektiert. Die pDNA wurde (3) isoliert und auf Korrektheit geprüft (*HaeII* Restriktionsverdau bzw. Sanger-Sequenzierung von *mprF*). Folgend wurde das Plasmid (4) mittels Elektroporation in elektrokompente SA113Δ*mprF* transformiert und Transformanten über CHL und ST R selektiert. Nach der (5) Isolation der pDNA und anschließender Überprüfung des Plasmids (*HaeII* Restriktionsverdau bzw. Sanger-Sequenzierung von *mprF*) wurde die DAP-MHK der Transformanten und der Kontrollen (rechts) über die MBV bestimmt. Kontrollen: SA113 WT, SA113Δ*mprF*, SA113Δ*mprF* + *pRB474*, SA113Δ*mprF* + *pRB474-mprF*, ATCC29213.

2.2.3.4.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli*

Um eine hohe Transformationseffizienz von *E. coli* IM08B zu erzielen, erzeugten wir chemokompetente Wirtszellen mittels der Kalziumchlorid-Methode nach Hanahan (1983). Obwohl die involvierten Mechanismen der Prozedur noch weitestgehend unbekannt sind, wird vermutet, dass positiv geladenen Kalzium-Ionen die Bindung von pDNA an Lipopolysaccharide (LPS) fördern und somit die Aufnahme extrachromosomaler DNA erleichtern. Zur Durchführung der Methode wurden 5 mL LB-Medium (Laboratories CONDA S.A.) mit einer Einzelkolonie von *E. coli* IM08B inokuliert und der Ansatz über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in einem Verhältnis von 1:100 in 100 mL LB-Medium verdünnt und die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ (optische Dichte) von 0,6 unter Schütteln (100 rpm) bebrütet. Im Anschluss wurde der Ansatz in 2 x 50 mL vorgekühlte konische Zentrifugenröhrchen transferiert und bei 4.000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 25 mL vorgekühltem 0,1 M MgCl₂ auf Eis resuspendiert. Folgend wurden die Ansätze für 10 min auf Eis inkubiert und erneut bei 4.000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 25 mL vorgekühltem 0,05 M CaCl₂ auf Eis gelöst. Anschließend wurde der Ansatz 20 min auf Eis inkubiert und unter gleichbleibenden Bedingungen zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Pellets in 10 mL vorgekühltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und zu je 100 µL aliquotiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der Zellen bei -70 °C.

2.2.3.4.2 Herstellung elektrokompetenter *S. aureus*

Zur Erzeugung elektrokompetenter *S. aureus* Sa113Δ*mprF* Zellen wurden 5 mL B2-Medium (Eigenherstellung) mit einer Einzelkolonie *S. aureus* Sa113Δ*mprF* inokuliert und der Ansatz bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in einem Verhältnis von 1:100 in 50 mL B2-Medium verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ (optische Dichte) von 0,8 unter Schütteln (100 rpm) bebrütet. Alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte wurden bei 5.000 x g für 15 min und Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Mit Erreichen einer OD₆₀₀ erfolgte die Überführung der Bakteriensuspension in ein 50 mL konisches Zentrifugenröhrchen und eine anschließende Zentrifugation. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 50 mL sterilem ddH₂O resuspendiert und der Ansatz erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zwei weitere Male wiederholt. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen in 10 mL 10 % Glycerol-Lösung resuspendiert und durch Zentrifugation pelletiert. Nach der wiederholten Durchführung dieses Schrittes erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 5 mL 10 % Glycerol-Lösung und ein weiterer Zentrifugationsschritt. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 5 mL 10 % Glycerol-Lösung resuspendiert. Im Anschluss an eine finale Zentrifugation wurde der Überstand bis auf 500 µL verworfen und das Zellpellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Um eine hohe Transformationseffizienz zu gewährleisten, stellten wir die elektrokompetenten *S. aureus* Sa113Δ*mprF* Zellen vor jeder Elektroporation frisch her.

2.2.3.4.3 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Für die Transformation von pDNA in *E. coli* IM08B nutzten wir die Hitzeschock-Methode nach Hanahan (1983). Hierfür wurden 100 µL der in 2.2.3.4 hergestellten, kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, die Zellsuspension mit 100 ng pDNA versetzt und der Transformationsansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss an den Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 45 Sekunden, bei dem die Aufnahme der plasmidalen DNA erfolgt, wurden die Zellen für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 900 µL kaltem SOC-Medium (Eigenherstellung) versetzt und für 60 min bei 37 °C unter Schütteln (100 rpm) inkubiert. Nach 2-minütigem zentrifugieren bei 6000 x g und RT wurde das Pellet in 100 µL verbleibendem SOC-Medium resuspendiert und die Suspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (25 µg/mL ST R + 10 µg/mL CHL) ausplattiert. Im Anschluss an eine Inkubation über Nacht bei 37 °C konnte die Transformationseffizienz (T) wie folgt ermittelt werden.

$$T = \frac{\text{Anzahl der Kolonien (cfu)} \times \text{Gesamtvolumen}(\mu\text{L})}{\text{ausplattiertes Volumen}(\mu\text{L}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \mu\text{g DNA}}$$

Die Formel gibt an, wie viele Kolonien pro µg eingesetzter DNA aus einem Transformationsansatz hervorgehen (Anzahl an Kolonien / µg eingesetzte DNA).

2.2.3.4.4 Transformation von Plasmiden in *S. aureus*

Für die Transformation von pDNA in *S. aureus* Sa113Δ*mprF* verwendeten wir die Elektroporation. Bei dieser Methode wird ein elektrischer Impuls mit hoher Feldstärke genutzt, um die Zellmembran der Bakterien zu permeabilisieren und die Aufnahme von extrachromosomaler DNA zu ermöglichen. Ein Transformationsansatz setzte sich aus 1 µg pDNA und 70 µL der in 2.2.3.4.2 hergestellten, elektrokompenten Zellen zusammen. Nachdem die DNA zu den Zellen gegeben wurde, wurde die Zellsuspension für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend überführten wir den Ansatz in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 15 mm. Die Elektroporation erfolgte in dem Gene Pulser® II (Bio-Rad Laboratories, Inc.) unter folgenden Bedingungen: 2.0 kV, 100 Ω, 25 µF. Im direkten Anschluss erfolgte die Zugabe von 500 µL B2 Bouillon (Eigenherstellung) und die Überführung der Zellen in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen bei 6000 x g für 2 min bei RT pelletiert und in 100 µL Medium resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend auf TSB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert (2.5 µg/mL ERY + 10 µg/mL CHL) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Transformationseffizienz ermittelten wir wie unter 2.2.3.4.3 beschrieben.

2.2.3.4.5 Herstellung von Primern für die ortsspezifische Mutagenese

Für die Generierung von Mutagenese Primern folgten wir den Richtlinien des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kits von Stratagene (Kalifornien, USA). Zur Überprüfung der Primer nutzten wir das Web-basierte Tool PrimerX (<http://bioinformatics.org/primerx/>). Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden keine hochgereinigten Primer verwendet. Genaue Informationen zu den Primern können der Tabelle 11 entnommen werden.

2.2.3.4.6 Ortsspezifische Mutagenese

In dieser Arbeit wurde die ortsspezifische Mutagenese zur Erzeugung von Punktmutationen in *mprF* von pRB474-*mprF* genutzt. Unter Verwendung der in 2.2.3.4.5 synthetisch generierten Primer und einer High Fidelity DNA Polymerase wurde die Replikation beider Plasmidstränge durchgeführt und das mutierte PCR Produkt mit der Endonuklease *DpnI* behandelt. Dieses Enzym erkennt und schneidet *dam* methylierte Sequenzabschnitte (Zielsequenz: 5'-Gm⁶ATC-3') und führt somit zu einem Verdau der parentalen Template DNA. Ein Reaktionsansatz für die ortsspezifische Mutagenese setzte sich wie folgt zusammen:

10 µM Forward Mutagenese-Primer	2.5 µL
10 µM Reverse Mutagenese-Primer	2.5 µL
2 x Phusion HF Master Mix	25 µL
Plasmid DNA	x µL (10 ng)
ddH ₂ O	auf 50 µL auffüllen

Bei der Zusammenführung der Reagenzien wurde stets auf Eis gearbeitet. Um einer Primerdegradierung durch die Exonuklease-Aktivität der DNA High Fidelity DNA Polymerase vorzubeugen, fügten wir dem Ansatz den Phusion HF Master Mix zum Schluss hinzu. Für die Mutagenese PCR verwendeten wir folgende Bedingungen:

Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec.	18 Zyklen
Denaturierung	98 °C	30 sec.	
Annealing	55 °C	60 sec.	
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	420 sec.	
Kühlung	4 °C	∞	

Nach der Zugabe von 1 µL *DpnI* und einer sechs-stündigen Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz in *E. coli* IM08B transformiert (2.2.3.4.3).

2.2.3.4.7 Kolonie-PCR

Für die rasche Überprüfung des Transformationserfolges von pRB474-*mprF* in *E. coli* nutzten wir die Kolonie-PCR. Dabei beschränkt sich die Methode auf den Nachweis der Anwesen- oder Abwesenheit der *mprF* Gensequenz. Als Ausgangsmaterial dienten einzelne *E. coli* Kolonien, die in 20 µL 0,9 % NaCl suspendiert wurden. Ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µL setzte sich wie folgt zusammen:

DreamTaq Green Master Mix 2X	24 µL
RW_mprF3-F (10 µM)	0,5 µL
RW_mprF3-R (10 µM)	0,5 µL
ddH ₂ O	24 µL
Zellsuspension	1 µL

Der Reaktionsansatz wurde in den PCR Thermocycler überführt und die PCR gemäß den unten aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Detaillierte Informationen zu den verwendeten Primern sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Für die Kolonie-PCR verwendeten wir folgende Bedingungen:

Initiale Denaturierung	98 °C	120 sec.	30 Zyklen
Denaturierung	98 °C	30 sec.	
Annealing	51 °C	30 sec.	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	420 sec.	
Kühlung	4 °C	∞	

Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels der Agarosegelelektrophorese (2.2.3.1.1) aufgetrennt und die Banden mittels SYBR® Safe (Invitrogen AG) im GelDoc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) visualisiert.

2.2.3.4.8 Restriktionsverdau von Plasmiden

Um den Transformationserfolg von pRB474-*mprF* in *E. coli* IM08B und *S. aureus* Sa113Δ*mprF* zu überprüfen, nutzten wir eine Restriktionsanalyse. Hierfür identifizierten wir anhand einer *in silico* Analyse Restriktionsschnittstellen für *HaeII* in pRB474-*mprF* und kalkultierten die Größe und Anzahl der zu erwartenden Fragmente (vergl. Tabelle 15).

Tabelle 15 | Verwendete Plasmide, Restriktionsenzyme und Puffer

Plasmid	Restriktionsenzym	Puffer	Schnittstellen	Fragmentgrößen [bp]
pRB474- <i>mprF</i>	<i>HaeII</i>	10X CutSmart®	5	374, 1353, 1513, 2283, 2940

Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

<i>HaeII</i>	1 µL
10X CutSmart®	5 µL
pDNA	x µL (500 ng)
ddH ₂ O	auf 50 µL auffüllen

Die Restriktionsansätze wurden für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftragung des Restriktionsanstazes auf einem 1,5-prozentigen (w/v) Agarosegel. Die Gelbanden wurden mittels EtBr unter UV-Licht sichtbar gemacht (GelDoc™ XR+, Bio-Rad Laboratories, Inc.) und mittels Image Lab™ 6.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) digital dokumentiert.

2.2.4 Bioinformatische Methoden

2.2.4.1 Identifikation und Auswahl von Referenzgenomen

Zur Identifizierung optimaler Referenzgenome verwendeten wir das Tool *refRank* [208]. Dieses Tool greift auf einen randomisierten Teil von NGS Reads zurück, welche anschließend auf eine Kollektion von Referenzgenomen aligniert werden. Die Rangfolge der Referenzsequenzen wird auf Grundlage der normalisierten und gemittelten Basenabdeckung ermittelt. In dieser Arbeit nutzten wir einen Pool aus sämtlichen *S. aureus* Referenzgenomen, die zum derzeitigen Zeitpunkt bei NCBI vollständig rekonstruiert vorlagen (n = 142; Stand: 10.03.2017).

Für die phylogenetischen Analysen und Assoziationsstudien der DAP Studie wählten wir das *S. aureus* Referenzgenom COL (ST 250, MRSA, acc. no. NC-002951) aus. Im Gegensatz dazu nutzten wir für die phylogenetischen Analysen der CPT-Studie *S. aureus* ECT-R2 (ST 5, MSSA, acc. no. NC-017343). Da ECT-R2 jedoch kein *SCCmec* trägt, wurde für die PLINK und SEER Analysen *S. aureus* 04-02981 (ST 225, MRSA, acc. no. NC-017340, *SCCmec* Typ II (2A)) verwendet.

2.2.4.2 Phylogenetische Analysen

Eine Vielzahl an Algorithmen, die zur Erstellung phylogenetischer Bäume entwickelt wurden, tendieren dazu, Rekombinationsereignisse zu überschätzen. Aus diesem Grund überprüften wir die Referenzgenome *S. aureus* COL (NC-002951) und ECT-R2 (NC-017343) auf die Anwesenheit von mobilen genetischen Elementen, wie Transposasen und Phagen und entfernten selbige aus dem Genom (siehe Anhang 4 und Anhang 5). Zusätzlich wurden Resistenz-vermittelnde Gene von den Analysen ausgeschlossen, um zu vermeiden, dass konvergent entstandene SNPs die Baumtopologie beeinflussen (siehe Anhang 4 und Anhang 5).

Im Anschluss an die Editierung der Referenzen wurden qualitativ hochwertige *paired-end* Reads (vergl. 2.2.3.3.4) unter Verwendung von *Seqrec* (DAP-Studie) bzw. *batchMap* (CPT-Studie) gegen die modifizierten Referenzgenome aligniert und Alignments der Referenzlängen-limitierten Consensus-Sequenzen erstellt. Anschließend wurden die Alignments unter Verwendung des *snpFilter* [208] und einer Exklusionsdistanz (ED) von 150 bp auf variante Positionen reduziert und in separaten SNP-Alignments vereint. Die Verwendung einer Exklusionsdistanz ermöglichte uns, in räumlicher Nähe zueinander liegende SNPs von den Analysen auszuschließen, da eine Anhäufung von Mutationen auf Rekombinationsereignisse hindeutet. Diese Vorgehensweise ist notwendig, da die entsprechenden Bereiche nicht als einzelne Rekombinationsereignisse wahrgenommen werden, sondern jeder SNP als individuelle Differenz zum Referenzgenom gewertet wird. Im Folgenden generierten wir mittels Geneious v. 10.0.5.0 SNP-basierte Neighbor-Joining Bäume (Tamura-Nei Distanz [219]) mit Bootstrap-Support (100 Teildatensätze). Für die Illustration der Ergebnisse verwendeten wir iTOL v3.2.4 [220].

2.2.4.3 Genomweite Assoziationsstudien

2.2.4.3.1 Genomrekonstruktion und Generierung von Input-Dateien

PLINK vergleicht Allelfrequenzen miteinander. Aus diesem Grund schalteten wir den Analysen eine referenzbasierte Genomrekonstruktion der zu untersuchenden Isolate vor. Hierfür wurden qualitativ hochwertige *paired-end* Reads (2.2.3.3.4) mittels *Seqrec* (DAP-Studie) bzw. *batchMap* (CPT-Studie) gegen die zuvor bestimmten Referenzgenome aligniert (DAP-Studie: NC-002951; CPT-Studie: NC-017340). Dabei erreichten wir für die Isolate der DAP- und CPT-Studie eine durchschnittlich 98-fache bzw. 135-fache Abdeckung der Referenzgenome. Die durch die Pipelines generierten *reflength-alignments* wurden im Anschluss als Input-Dateien für den *snpFilter* [208] verwendet. Im Gegensatz zu den phylogenetischen Analysen nutzten wir hier keine ED. Die resultierenden SNP-Alignments der DAP- und CPT-Studie umfassten 108.279 bzw. 61.974 SNPs, welche wir anschließend zur Erstellung der PLINK Input-Dateien verwendeten. Hierbei ist zu beachten, dass das Tool keine triallelischen Marker verarbeiten kann. Aus

diesem Grund modifizierten wir das SNP-Alignment dahingehend, dass an entsprechenden Positionen die seltener auftretenden SNPs durch die dominante Variante ersetzt wurden (im Haus entwickeltes Skript).

Als Alternativansatz nutzten wir das Tool SEER, welches im Gegensatz zu PLINK *de novo* assemblierte Reads (Contigs) als Input-Dateien verwendet. Somit eröffnete uns das Tool die Möglichkeit, Rekombinationsereignisse und Unterschiede im Gen-Gehalt auf eine Assoziation zur beobachteten Merkmalsausprägung zu testen. Für die Generierung der Contigs verwendeten wir die A5-miseq Pipeline. Dabei erhielten wir für die DAP- und CPT-Studie durchschnittlich 35 bzw. 58 Contigs pro Isolat mit einer durchschnittlichen Länge von 88.370 bzw. 62.170 bp.

2.2.4.3.2 GWAS – PLINK Analysen

PLINK ist ein Open Source Tool, das dazu entwickelt wurde, umfangreiche Assoziationsstudien, insbesondere die Analyse von Genotyp-/Phänotyp-Korrelationen, recheneffizient durchzuführen [173]. Im Anschluss an die Erzeugung der PLINK Input-Dateien (vergl. 2.2.4.3.1), erfolgte die in PLINK integrierte Qualitätskontrolle (vergl. Abbildung 13). Initial schlossen wir SNPs, die eine Minor-Allel-Frequenz (MAF) $< 0,05$ aufwiesen, über folgenden Befehl (*Bourne-again shell*, Bash) aus:

```
plink 1.9 --file --maf 0,05 --make-bed --allow-no-sex --out (B1)
```

Die MAF bezieht sich auf die Häufigkeit, mit der das zweithäufigste Allel in einer Population auftritt. Da der *snpFilter* bereits Positionen mit fehlenden oder nicht eindeutigen Sequenzdaten verwirft, konnte auf eine Überprüfung der Genotypen verzichtet werden. Zur Detektion von Ausreißern, d.h. Isolaten, die sich von einer sonst homogenen Population signifikant unterscheiden, ermittelten wir den Z-Wert (vergl. <http://zzz.bwh.harvard.edu/plink>) und schlossen bei Bedarf Isolate von der Analyse aus, die weniger als 3 Standardabweichungen unter dem Gruppenmittel lagen (vergl. Anhang 6).

```
plink 1.9 --bfile --cluster --neighbour 1 5 --allow-no-sex (B2)
```

Im Anschluss an die Qualitätskontrolle nutzten wir *hierBAPS* zur Ableitung von Populationsstrukturen [196] (vergl. Abbildung 13). Auf der Grundlage der identifizierten Kovariablen und unter Verwendung des Cochran-Mantel-Haenszel Tests (CMH) wurde die PLINK Assoziationstestung durchgeführt.

```
plink 1.9 --bfile --mh --within --allow-no-sex --adjust --out (B3)
```

Um potentielle Störfaktoren zu detektieren, erstellten wir mittels *qqman* einen Quantile-Quantile (Q-Q) Plot, der den beobachteten und erwarteten *p*-Wert unter der Nullhypothese keiner wahren Assoziation vergleicht und eine Einschätzung des Ausmaßes von systematischen Verzerrung erlaubt. Zusätzlich ermittelten wir den genomischen Inflationsfaktor λ_{GC} , der den Grad der Verzerrung quantifiziert und in Anwesenheit von systematischen Verzerrungen Werte > 1 aufweist. Im Fall einer starken Abweichung der empirischen und theoretischen Quantile (ausgeschlossen sind Abweichungen im Endbereich) nutzten wir

GC-korrigierte p -Werte, die auf Grundlage des λ_{GC} normalisiert wurden [221]. Final erstellten wir mittels *qqman* einen Manhattan Plot, der die genomweiten Signifikanzniveaus der SNPs in Bezug auf ihre Genomposition zeigt. Zum Zweck der Veranschaulichung schlossen wir SNPs mit einem $-\log_{10} p$ -Wert von 0 von der Analyse aus.

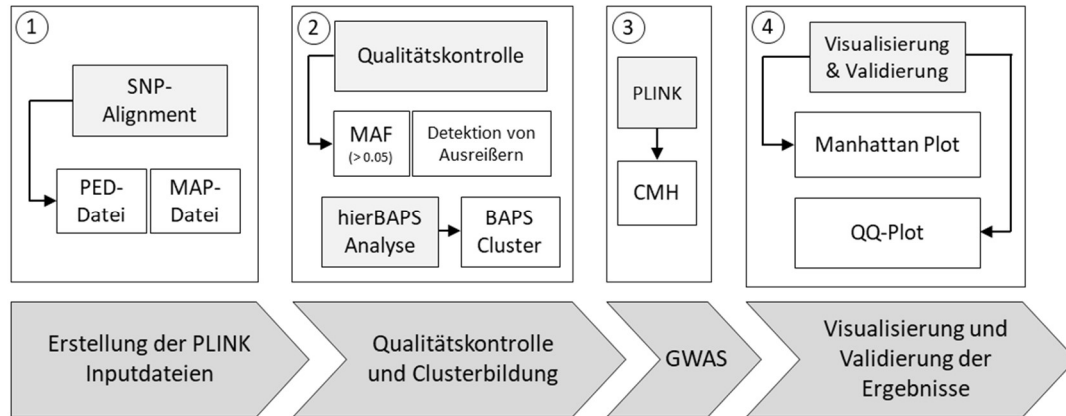


Abbildung 13 | Fließschema einer PLINK GWAS. Der Ablauf einer beispielhaften PLINK Analyse gliedert sich auf in die Erstellung der PLINK Input-Dateien (1), die Qualitätskontrolle und die Identifizierung von Populationsstrukturen (2), die PLINK Assoziationstestung (3) und die Visualisierung und Validierung der generierten Ergebnisse (4).

2.2.4.3.3 GWAS – SEER Analysen

SEER dient der Identifizierung von Sequenzelementen (K-mere), die signifikant mit einem Phänotyp von Interesse korrelieren. Soweit nicht anders beschrieben, richteten wir uns bei der Durchführung der Analysen nach den Angaben des Entwicklers (<https://github.com/johnlees/seer/wiki>, Version 21.03.2017). Vorab schlossen wir durch PLINK definierte Ausreißer von den Analysen aus (vergl. Anhang 6). Im Anschluss an die Erstellung der benötigten Input-Dateien wurden die in 2.2.4.3.1 generierten Contigs für die Zählung der K-mere über den Befehl

```
seer 1.4.1 fsm-lite -v -s 5 -S 95 -l -t
```

 (B4)

sowie die Ableitung der Populationsstruktur verwendet (vergl. Abbildung 14).

```
seer 1.4.1 kmbs -k -p --no_filtering --size 200000 -o --threads --write_distances
```

 (B5)

Folgend wurde auf der Grundlage der erstellten Distanzmatrix und der gezählten K-mere die eigentliche Assoziationstestung durchgeführt (vergl. Abbildung 14). Im selben Zuge wurden K-mere mit einer $MAF < 5\%$ von der Analyse ausgeschlossen.

```
seer 1.4.1 seer -k -p --struct --threads --maf 0,05 --print_samples --pval 1 --chisq 1
```

 (B6)

Bevor der Output interpretiert werden konnte, erfolgte die Qualitätsfilterung, bei der wir K-mere einem $\beta_1 \leq 0$ (*filter_seer*) und einer Länge < 20 bp verwarfen (im Haus entwickeltes Skript) (vergl. Abbildung 14).

seer 1.4.1 filter_seer -k --pos_beta --chisq --sort chisq

(B7)

Durch die anschließende Erstellung eines Q-Q Plots mittels *qqman* konnten wir den Einfluss der *population stratification* auf die Ergebnisse bestimmen. Im Falle einer starken Abweichung des beobachteten vom erwarteten p -Werts wurde der Likelihood-Quotienten-Test p -Wert (DAP-Studie) bzw. der Wald-Test p -Wert (CPT-Studie) verwendet. Im Zuge des anschließenden Read-Alignments nutzten wir ausschließlich K-mere, deren $-\log_{10} p$ -Werte die suggestive Assoziationsgrenze (1×10^{-5}) überschritten und einen $-\log_{10} p$ -Wert > 0 aufwiesen. Im Falle der Detektion von nicht-synonymen SNPs wurde überprüft, inwiefern die Mutation einen Einfluss auf die Proteinfunktion hat. Hierzu nutzten wir SIFT [207]. Zur Illustration der Ergebnisse verwendeten wir Phandango (vergl. Abbildung 14) [200].

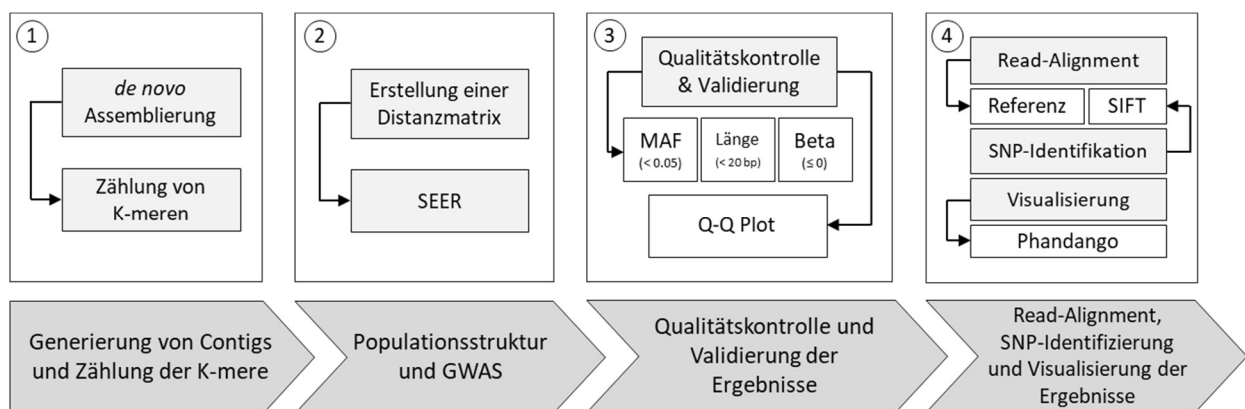


Abbildung 14 | Fließschema einer SEER GWAS. Der Ablauf einer beispielhaften SEER Analyse gliedert sich auf in die Genomrekonstruktion und die Zählung von K-meren (1), die Abschätzung der Populationsstruktur mit anschließender Assoziationstestung (2) die Qualitätskontrolle (3) und die Nachbereitung der Ergebnisse (4).

2.2.4.4 Identifizierung seltener SNPs

Zum Nachweis seltener Mutationen, die mit dem Phänotyp von Interesse assoziiert sind ($MAF < 1\%$) und Mutationen, die mit einer niedrigeren Frequenz auftreten ($MAF 1-5\%$), haben wir eine Ahnenrekonstruktion in Mesquite v2.75 durchgeführt. Zu diesem Zweck erstellten wir aus den in 2.2.4.3.1 generierten SNP-Alignments phylogenetische Bäume (Neighbor-Joining, Tamura-Nei Distanz), welche im Nexus-Format in Mesquite importiert wurden. Die anschließende Analyse erfolgte über *Trace Character History* und *Parasimony Ancestral States*. Nachfolgend nutzten wir die PLINK MAP-Dateien in Kombination mit dem jeweiligen Referenzgenom, um Informationen über die Position von SNPs in Kandidatengenomen zu erhalten. Es wurden alle Mutationen dokumentiert, die ausschließlich in resistenten *S. aureus* Isolaten auftraten und eine $MAF < 5\%$ aufwiesen.

2.2.4.5 SCCmec Analyse

Zur Identifikation und Charakterisierung von SCCmec Typen nutzten wir den SCCmecFinder mit Standardeinstellungen (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/sccmecfinder/>) [206]. Als Input-Dateien dienten *de novo* assemblierte Reads (Contigs). Zusätzlich nutzten wir ein im Haus entwickeltes Skript und die von dem Tool generierten Genreports, um die identifizierten SCCmec Elemente aus den Contigs zu extrahieren. Über den progressiven Mauve-Algorithmus [198] wurden die entsprechenden Sequenzen aligniert und auf Mutationen hin untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Überprüfung kommerziell erhältlicher Testsysteme zur Bestimmung der DAP-MHK bei *S. aureus*

Das nationale Referenzzentrum für Staphylokokken und Enterokokken (NRZ) startete die routinemäßige Erfassung der DAP-MHK in 2008. Bis 2017 gingen mehr als 38.000 *S. aureus* Einsendungen mit dem Auftrag zur Spezies-/Resistenzbestimmung oder Typisierung am NRZ ein. Im Zuge der routinemäßigen Untersuchungen erfolgte die Ableitung des *spa*-Typs, die Testung auf freie Koagulase und die *in vitro* Empfindlichkeitsprüfung gegenüber 19 Antibiotika, inklusive DAP (vergl. Anhang 7). Obwohl die Anzahl an *S. aureus* Einsendungen über die Jahre stabil blieb, konnte seit 2011 ein stetiger Anstieg des Anteils von DAP-R Isolaten, insbesondere der DAP-R MSSA Isolate, verzeichnet werden (vergl. Abbildung 15).

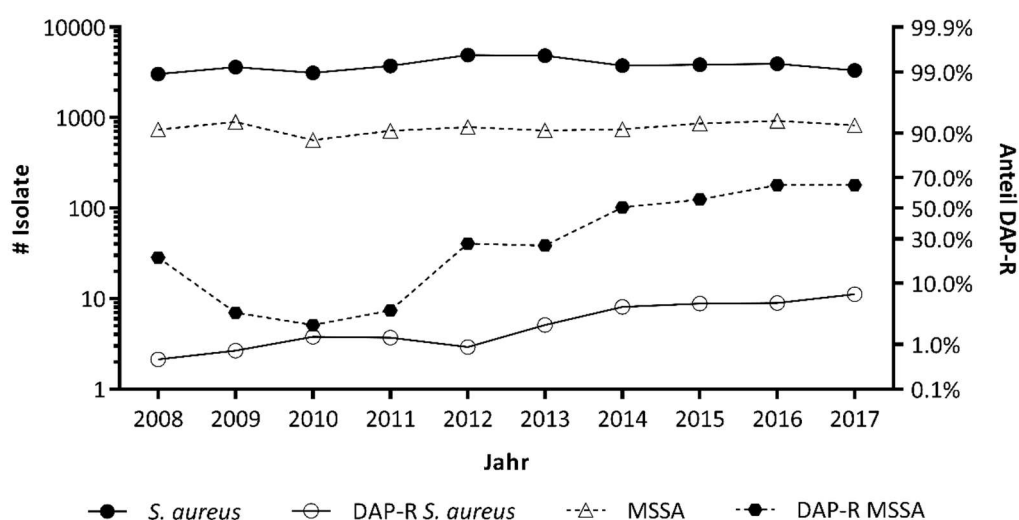


Abbildung 15 | Einsendungen von *S. aureus* Isolaten an das RKI von 2008 bis 2017. *S. aureus* beinhaltet sowohl MRSA als auch MSSA. DAP-R *S. aureus* gibt die relative Häufigkeit von *S. aureus* Isolaten mit einer Resistenz gegenüber DAP wieder (in Bezug auf alle *S. aureus* Einsendungen). DAP-R MSSA spiegelt die relative Häufigkeit von MSSA Isolaten unter allen DAP-R *S. aureus* Einsendungen wieder.

3.1.1 Konkordanz kommerzieller Testsysteme

Basierend auf der in dieser Arbeit etablierten *S. aureus* DAP-Stammkollektion (vergl. 2.1.12.1) validierten wir kommerziell erhältliche MHK-Teststreifen (Etest®, M.I.C Evaluator®, Daptomycin MIC test strip®) und das VITEK®2 Testsystem zur Bestimmung der DAP-MHK. Hierbei zeigte sich, dass die DAP-MHKs, welche durch die MHK-Teststreifen und das VITEK®2 System generiert wurden, in der Regel mit den Ergebnissen der MBV Referenzmethode in Übereinstimmung gebracht werden können (\pm eine Verdünnungsstufe) (vergl. Tabelle 16 und Abbildung 16). Dies gilt sowohl für MSSA als auch für MRSA Isolate. Ausschließlich 5 Isolat-MHK-Kombinationen zeigen eine Differenz von zwei \log_2 -Verdünnungsstufen (vergl. Tabelle 16

und Abbildung 16). Daraus ergibt sich für den M.I.C Evaluator®, den Etest®, den Daptomycin MIC test strip® und das VITEK®2 System eine Übereinstimmung von 98,1 %, 100 %, 98,1 % bzw. 99,1 % (vergl. Tabelle 16).

Von besonderem Interesse sind MHK Abweichungen, die zu einer falschen Interpretation des Phänotyps führen (sogenannte falsch-positive bzw. falsch-negative Fehler). Insgesamt detektierten wir 5 Isolat-MHK-Kombinationen, die in falsch-positiven Interpretationen (M.I.C. Evaluator®, Etest® und VITEK®2, je ein Isolat (0,9 %)), bzw. falsch-negativen Interpretationen (Daptomycin MIC test strip® und VITEK®2, je ein Isolat (0,9 %)) des DAP-Phänotyps resultierten (vergl. Abbildung 16). Daraus ergibt sich, in Relation zu der MBV Referenzmethode, eine kategorische Übereinstimmung von 99,1 % für die MHK-Teststreifen bzw. 98,2 % für das automatisierte VITEK®2 System. Hierbei ist anzumerken, dass die Bestimmung der DAP-MHK bei einem *S. aureus* Isolat zu der Ausbildung von drei falsch-positiven Fehlern führte (vergl. Weber *et al.*, 2017 [212], Tabelle S1). Zusätzlich beobachten wir, dass die MHKs des M.I.C. Evaluators®, des Daptomycin MIC test strips® und des VITEK®2 Systems dazu tendieren, leicht erhöht auszufallen, wohingegen die durch den Etest® bestimmten MHKs tendenziell geringer ausfallen (vergl. Tabelle 16 und Abbildung 16).

Tabelle 16 | Konkordanz zwischen DAP-MHKs verschiedener Testsysteme im Vergleich zu der MBV Referenzmethode. Grau schattierte Felder kennzeichnen eine DAP-MHK Differenz von einer log₂-Verdünnungsstufe zwischen der MBV Referenzmethode und des jeweiligen Testsystems.

Testsystem/Organismus	Anzahl der Isolate, für die die DAP-MHK um die entsprechende Verdünnungsstufe abwich					Übereinstimmung (%)
	-2	-1	0	+1	+2	
Etest®						
MRSA (n = 60)	0	18	35	7	0	100
MSSA (n = 47)	0	7	34	6	0	100
M.I.C. Evaluator®						
MRSA (n = 60)	0	7	35	17	1	98.3
MSSA (n = 47)	0	2	21	23	1	97.9
Daptomycin MIC test strip®						
MRSA (n = 60)	1	8	41	10	0	98.3
MSSA (n = 47)	0	3	28	15	1	97.9
VITEK® 2						
MRSA (n = 60)	0	2	33	23	0	100
MSSA (n = 47)	1	1	15	30	0	97.9

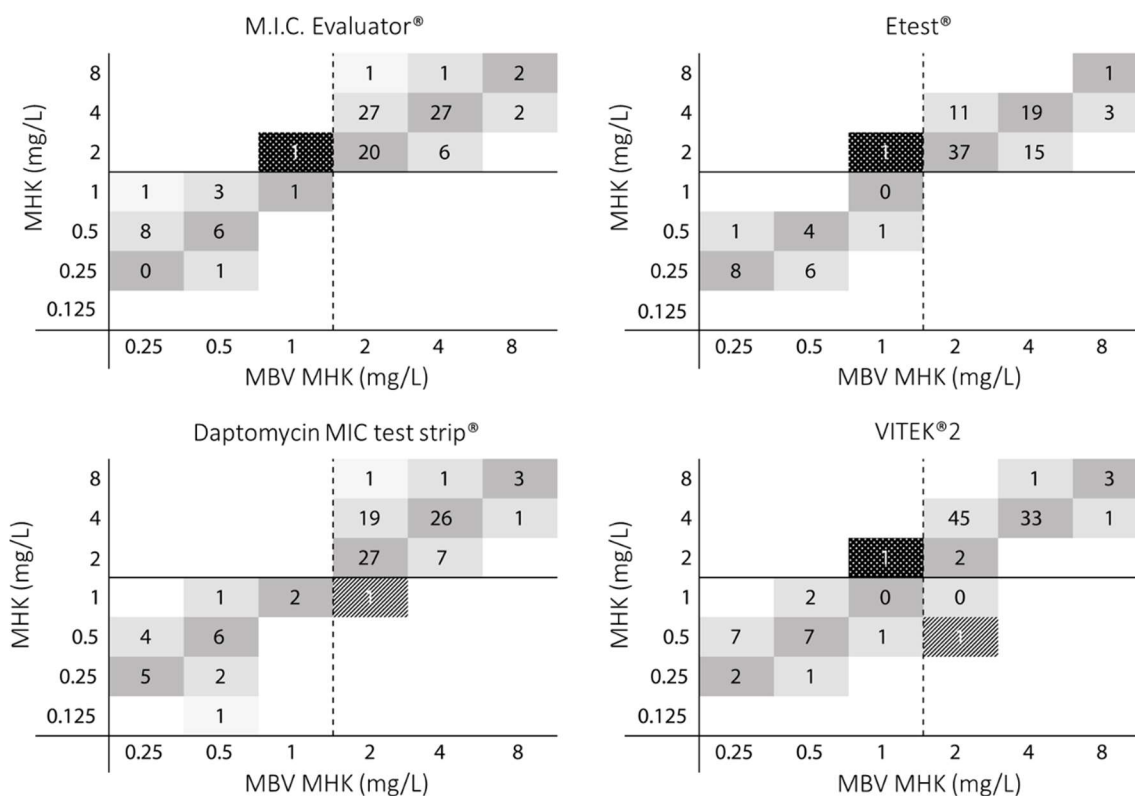


Abbildung 16 | Darstellung der Konkordanz bei der Bestimmung der DAP-MHK zwischen der MBV Referenzmethode und kommerziell erhältlichen Testsystemen. Insgesamt wurde die DAP-MHK von 107 *S. aureus* Isolaten mittels MBV, M.I.C. Evaluator®, Etest®, Daptomycin MIC test strip® und dem VITEK®2 System bestimmt. Die Nummern weisen auf die Anzahl an Isolaten mit einer entsprechenden DAP-MHK hin. Dunkelgrau schattierte Bereiche kennzeichnen eine exakte Übereinstimmung der Methoden in der Bestimmung der DAP-MHK, während grau und hellgrau schattierte Bereiche auf eine \log_2 -Abweichung bzw. auf eine Differenz von zwei \log_2 -Verdünnungsstufen hindeuten. Gemusterte Boxen kennzeichnen kategorische Fehler (falsch-positiv: gepunktet, falsch-negativ: schraffiert). Die DAP-MHK Grenzwerte sind als schwarze Linien dargestellt (EUCAST v6.0 2016, DAP-S ≤ 1 mg/L, DAP-R > 1 mg/L).

3.1.2 Vancomycin-Resistenz von DAP-R *S. aureus* Isolaten

Insgesamt zeigen 28 (33 %) der in dieser Studie untersuchten DAP-R *S. aureus* Isolate (n=86) erhöhte VAN MHKs (2 - 4 mg/L; vergl. Weber *et al.*, 2017, Tabelle S1). Während 13 dieser Isolate (15 %) als MRSA charakterisiert wurden, zeigen 15 Isolate (17 %) eine Empfindlichkeit gegenüber Methicillin (MSSA Isolate).

3.2 GWAS zur Identifikation Resistenz-vermittelnder Mutationen

3.2.1 Phylogenetische Analysen

Zur Durchführung der DAP- und CPT-GWAS etablierten wir *S. aureus* Stammkollektionen entsprechend der in 2.1.12.2 bzw. 2.1.12.3 beschriebenen Vorgehensweisen. Anschließend wurden die Verwandtschaftsverhältnisse anhand phylogenetischer Bäume rekonstruiert (vergl. Abbildung 17 und Abbildung 18). Hierbei zeigt sich, dass wir für die klonalen Gruppen der DAP-Studie eine homogene Verteilung der DAP Resistenz-Phänotypen erreichten (vergl. Abbildung 11A und Abbildung 17). Davon ausgeschlossen sind die *S. aureus* Isolate mit dem ST 78 und 101, für die keine DAP-S Gegenparts ausgemacht werden konnten. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der CPT-Studie, bei der sich auf der Grundlage der berechneten Phylogenie eine deutliche Clusterung von phänotypisch CPT-R *S. aureus* Isolaten innerhalb der CCs und STs zeigt (vergl. Abbildung 18). Dies betrifft vor allem Isolate mit dem ST 111 und 228.

Im Falle der DAP-Studie detektierten wir innerhalb der CCs 5 und 22 ein bzw. drei *S. aureus* Isolate mit einer DAP-MHK von 8 mg/L (vergl. Abbildung 17) Diese Isolate sind von besonderem Interesse, da klinische *S. aureus* Isolate äußerst selten DAP-MHKs > 4 mg/L erreichen. Zusätzlich weisen zwei der Isolate eine phänotypische Resistenz gegen VAN auf (VAN MHK > 16 mg/L) (vergl. Abbildung 17)

3.2.2 Korrektur von Populationsstrukturen in PLINK

Um die unseren Stammkollektiven unterliegenden Populationsstrukturen in den folgenden PLINK Assoziationsstudien zu berücksichtigen, verwendeten wir *hierBAPS* Subpopulationen als Kovariablen in den Assoziationstestungen. Zusätzlich berücksichtigten wir den genomischen Inflationsfaktor λ_{GC} und leiteten den Grad der *population stratification* aus einem Q-Q Plot ab. Für die DAP GWAS zeigte sich im Q-Q Plot, dass die beobachteten von den erwarteten $-\log_{10} p$ -Werten abweichen (vergl. Abbildung 19A). Zusätzlich wurde ein λ_{GC} von 2,15 ermittelt (vergl. Abbildung 19A). Folglich schlossen wir *S. aureus* Isolate mit den zugeordneten Sequenztypen 78 und 101 sowie PLINK definierte Ausreißer von der PLINK Analyse aus (vergl. Anhang 6). Die finale PLINK Assoziationstestung umfasste 90 *S. aureus* Isolate, 6 *hierBAPS* Cluster (vergl. Anhang 8) und 66.667 SNPs. Im Zuge dieser Anpassungen erreichten wir eine Annäherung der $-\log_{10} p$ -Werte an die X=Y Referenzlinie des Q-Q Plots und einen λ_{GC} von 1 (vergl. Abbildung 19B).

Tree scale: 0.01

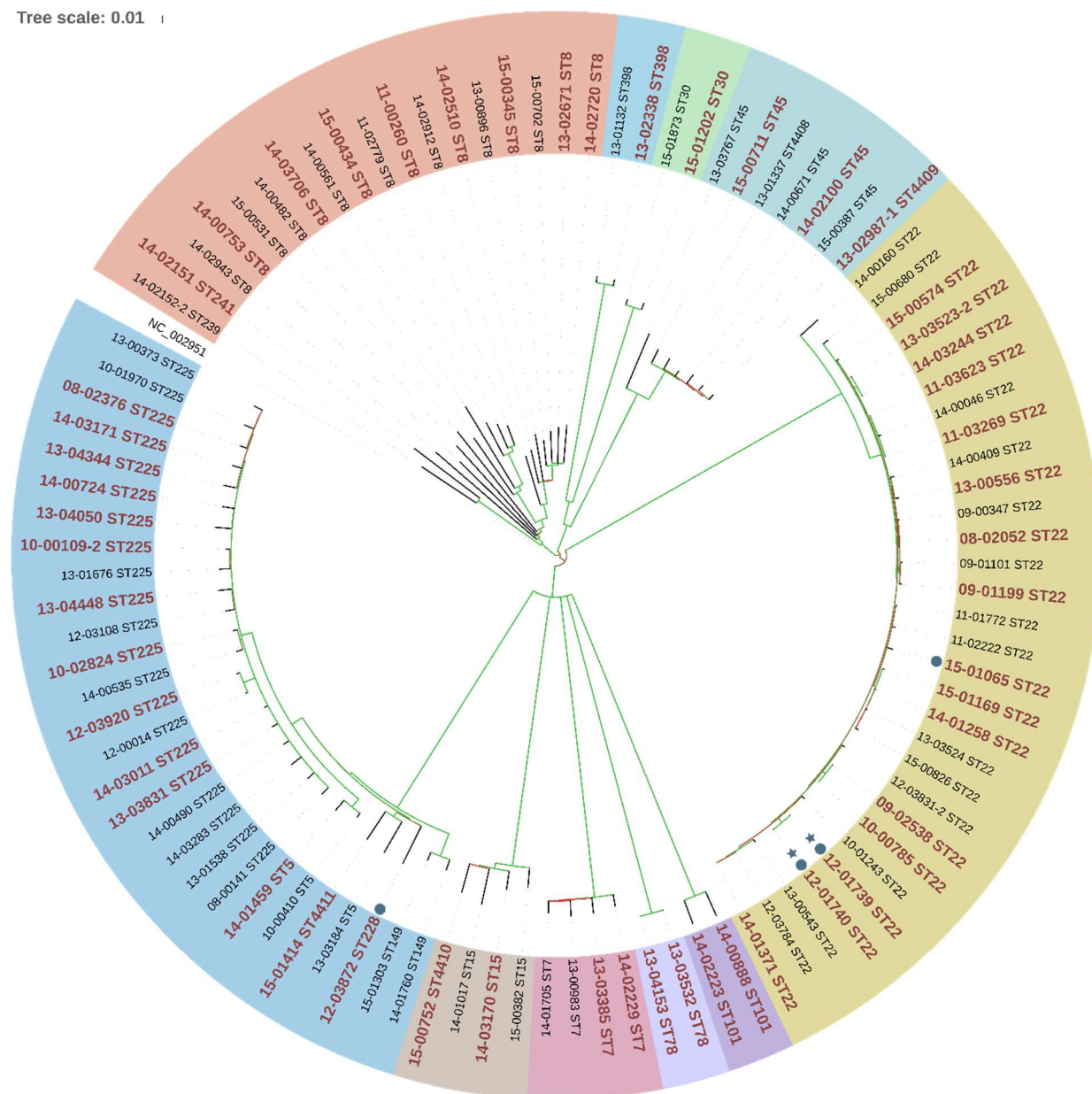


Abbildung 17 | Neighbor-Joining Baum von 99 *S. aureus* Isolaten zur Identifizierung DAP-R assoziierter Mutationen. Der phylogenetische Baum basiert auf 7342 SNPs. Als Referenzgenom wurde das modifizierte *S. aureus* COL Genom verwendet (NC-002951; vergl. 2.2.4.2). Die SNPs wurden mit einer ED von 150 extrahiert. Die MLST-Typen werden durch farbige Boxen dargestellt. Rot hervorgehobene Isolate kennzeichnen DAP-R *S. aureus* Isolate. Blaue Punkte und Sterne repräsentieren *S. aureus* Isolate mit DAP-MHKs von 8 mg/L bzw. DAP-R *S. aureus* Isolate mit einer Unempfindlichkeit gegenüber VAN. Die Bootstrap-Werte sind farblich kodiert (Minimum = rot, Maximum = grün).

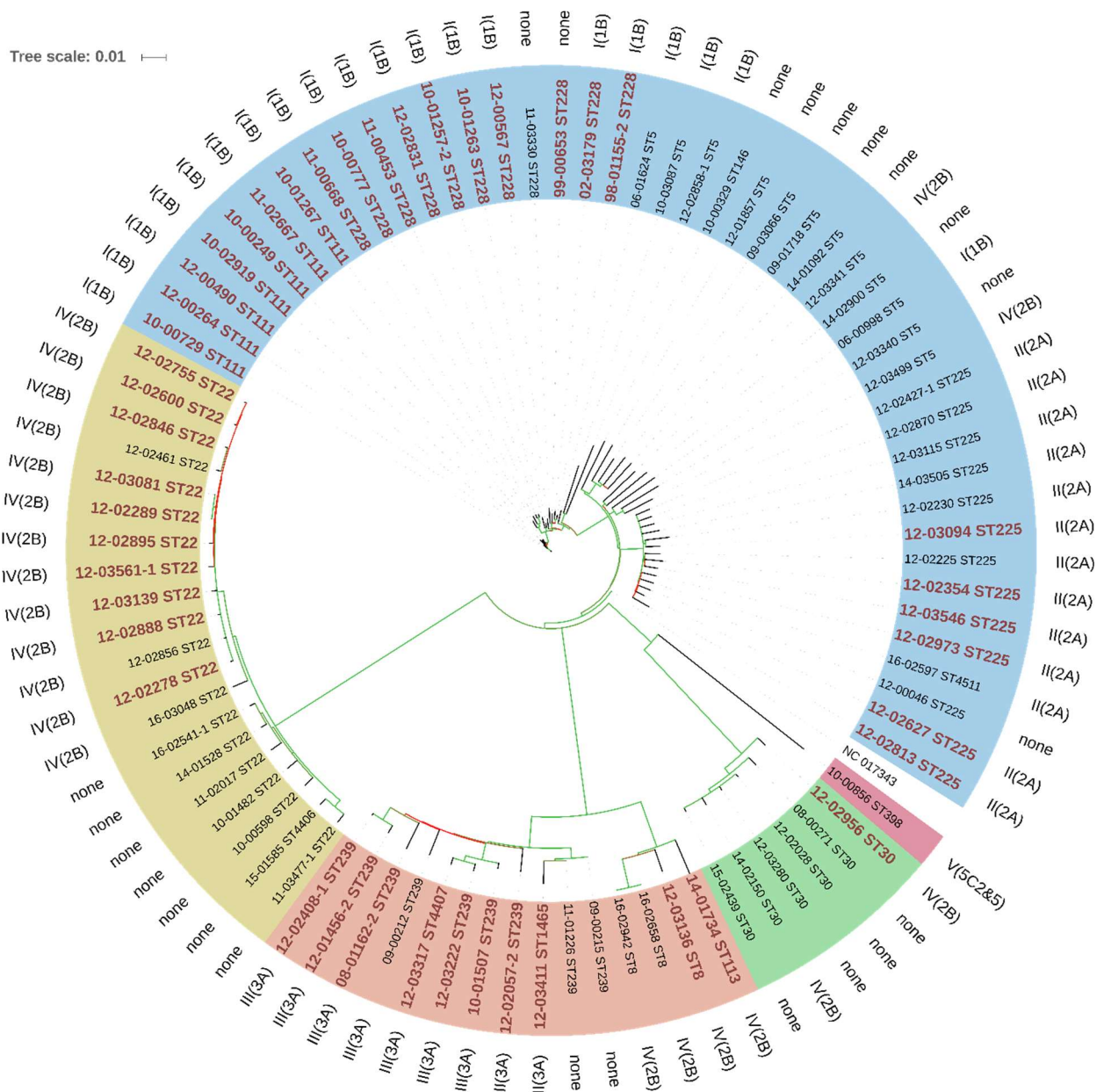


Abbildung 18 | Neighbor-Joining Baum von 88 *S. aureus* Isolaten zur Identifizierung CPT-R assoziierter Mutationen. Der phylogenetische Baum basiert auf 4344 SNPs. Als Referenzgenom wurde das modifizierte *S. aureus* ECT-R2 Genom (NC-017343; vergl. 2.2.4.2) verwendet. Die SNPs wurden mit einer ED von 150 extrahiert. Die MLST-Typen werden durch farbige Boxen dargestellt. Rot hervorgehobene *S. aureus* Isolate kennzeichnen CPT-R *S. aureus* Isolate. Die Bootstrap-Werte sind farblich kodiert (Minimum = rot, Maximum = grün). Auf der Außenseite sind die SCCmec Typen dargestellt.

Obwohl wir für die CPT-Stammsammlung mittels *hierBAPS* ausschließlich 4 Subpopulationen identifizierten, wiesen wir den *S. aureus* Isolaten mit den ST 111 und 228 einen weiteren Subcluster zu (vergl. Anhang 8). So nutzten wir in der anschließenden PLINK Assoziationsstudie 86 *S. aureus* Isolate, 5 *hierBAPS* Cluster und 45.989 SNPs zur Identifikation CPT-R assoziierter Mutationen. Im Q-Q Plot detektierten wir eine starke Abweichung der beobachteten von den erwarteten $-\log_{10} p$ -Werten und einen λ_{GC} von 2,11 (vergl. Abbildung 19C). Um dieser Abweichung entgegenzuwirken nutzten wir p -Werte, die auf der Grundlage des λ_{GC} normalisiert wurden (vergl. Abbildung 19D).

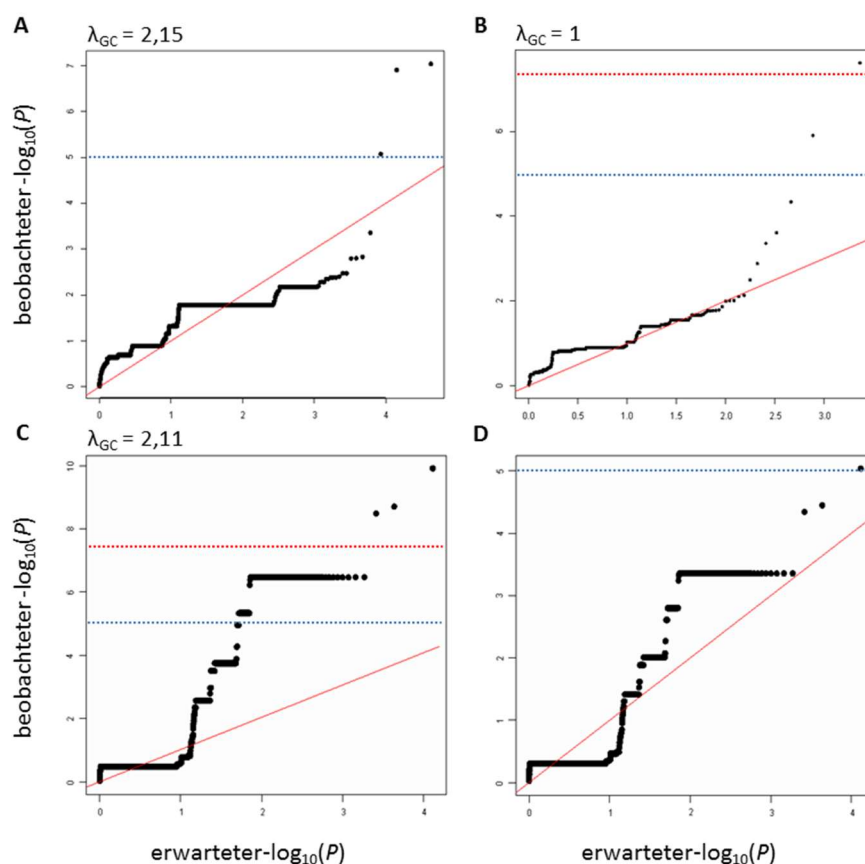


Abbildung 19 | Darstellung des Ausmaßes der *population stratification* in den durchgeführten PLINK Assoziationsstudien. 9A und 9B: Q-Q Plot der DAP PLINK GWAS auf der Grundlage nicht adjustierter $-\log_{10} p$ -Werte vor (A) und nach (B) dem Ausschluss von *S. aureus* Isolaten mit dem Sequenztyp 78 und 101 sowie PLINK definierten Ausreißern. 9C und 9D: Q-Q Plot der CPT PLINK GWAS auf der Grundlage nicht adjustierter $-\log_{10} p$ -Werte (C) und λ_{GC} adjustierter $-\log_{10} p$ -Werte (D). Die waagerecht verlaufende, rot gepunktete Linie zeigt die genomweite Signifikanzgrenze ($-\log_{10} p$ -Wert = 5×10^{-8}), während die waagerecht verlaufende, blau gepunktete Linie die suggestive Assoziationsgrenze darstellt ($-\log_{10} p$ -Wert = 1×10^{-5}). Oberhalb der einzelnen Abbildungen ist der ermittelte λ_{GC} Wert aufgeführt.

3.2.3 Korrektur von Populationsstrukturen in SEER

Zur Berücksichtigung von Populationsstrukturen nutzt SEER Distanzmatrizen und das Verfahren der Multidimensionalen Skalierung (MDS). Vor der Durchführung der SEER Assoziationsstudien schlossen wir *S. aureus* Isolate von den Analysen aus, die mittels PLINK als Ausreißer definiert wurden. Zusätzlich entfernten wir aus der DAP-Stammsammlung die *S. aureus* Isolate mit den ST 78 und 101 (vergl. 3.2.2). Für die Generierung von Q-Q Plots nutzten wir K-mere, die durch die den Assoziationsstudien vorgeschalteten Qualitätsfilter selektiert wurden (vergl. 2.2.4.3.3). Bei Betrachtung der nicht adjustierten $-\log_{10} p$ -Werte der DAP-Studie wird deutlich, dass die beobachteten $-\log_{10} p$ -Werte von den erwarteten $-\log_{10} p$ -Werten abweichen (vergl. Abbildung 20A). Da die adjustierten $-\log_{10} p$ -Werte des Likelihood-Ratio-Tests (LRT) eine Annäherung an die X=Y Referenzlinie des Q-Q Plots zeigen (vergl. Abbildung 20B), nutzten wir für alle nachfolgenden Untersuchungen der DAP-Studie die LRT p -Werte. Bei der Betrachtung des Q-Q Plots der nicht adjustierten $-\log_{10} p$ -Werte der CPT-Studie, konnten wir eine deutliche Abweichung der beobachteten von den erwarteten $-\log_{10} p$ -Werten nachweisen (vergl. Abbildung 20C). Trotz des Abfalls des Signifikanzniveaus bevorzugten wir in diesem Fall die adjustierten p -Werte des parametrischen Wald-Tests, da sich die beobachteten und erwarteten $-\log_{10} p$ -Werte aneinander angleichen (vergl. Abbildung 20D).

3.2.4 Identifikation von DAP-R assoziierten Mutationen

Im Anschluss an die Qualitätskontrolle und PLINK Assoziationstestung verblieben 14.525 SNPs, deren Position (relativ zum Referenzgenom *S. aureus* COL (NC-002951)) und Signifikanzniveau ($-\log_{10} p$ -Wert) in einem Manhattan Plot illustriert wurden (vergl. Abbildung 21). Von allen Mutationen unterschritten ausschließlich *mprF* P314L (Locus-Tag SACOL_RS07105, p -Wert 2.39×10^{-9}) und *mprF* L826F (p -Wert 1.25×10^{-6}) die Signifikanzgrenze von 5×10^{-8} bzw. 1×10^{-5} (vergl. Abbildung 21). Zusätzlich detektierten wir die ASS *mprF* S337L, welche knapp oberhalb der suggestiven Assoziationsgrenze liegt (p -Wert 4.16×10^{-5} , vergl. Abbildung 21).

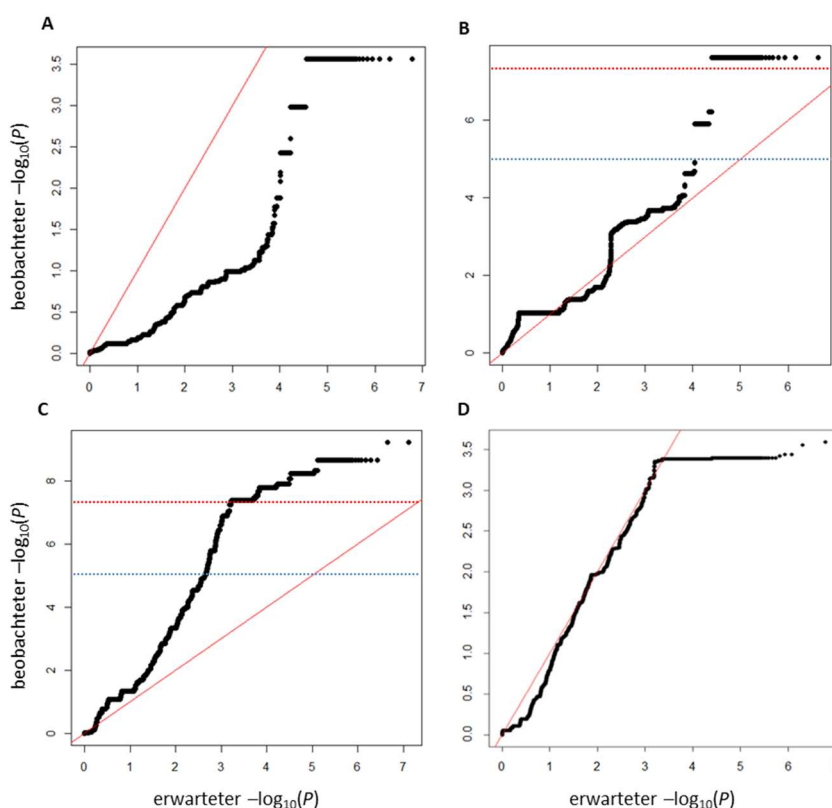


Abbildung 20 | Darstellung des Ausmaßes *population stratification* in den durchgeführten SEER Assoziationsstudien. 10A und 10B: Q-Q Plot der DAP SEER GWAS auf der Grundlage nicht adjustierter $-\log_{10} p$ -Werte (A) und LRT korrigierter $-\log_{10} p$ -Werte (B). 10C und 10D: Q-Q Plot der CPT SEER GWAS auf der Grundlage nicht adjustierter $-\log_{10} p$ -Werte (C) und Wald-Test adjustierter $-\log_{10} p$ -Wert (D). Die waagerecht verlaufende rot gepunktete Linie zeigt die genomweite Signifikanzgrenze ($-\log_{10} p$ -Wert = 5×10^{-8}), während die waagerecht verlaufende blau gepunktete Linie die suggestive Assoziationsgrenze darstellt ($-\log_{10} p$ -Wert = 1×10^{-5}).

In der SEER Analyse testeten wir rund 10 Millionen K-mere auf eine Assoziation zum DAP-R Phänotyp. Im Anschluss an die Qualitätsfilterung (LRT p -Wert > 0 , LRT $-\log_{10} p$ -Wert $> 1 \times 10^{-5}$, $\beta > 0$, Länge > 19 bp) verblieben 198 signifikante K-mere, die wir gegen das Referenzgenom *S. aureus* COL (NC-002951) Read-mappten. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der PLINK-Studie decken die signifikanten K-mere distinkte Bereiche von *mprF* ab (Position 1.406.100 - 1.406.296, 199-fache Abdeckung; Position 1.407.633 - 1.407.831 199-fache Abdeckung) und zeigen die Mutationen P314L und L826F (vergl. Abbildung 22). Zusätzlich überprüften wir nicht-signifikante K-mere (LRT p -Wert > 0 , $\beta > 0$, Länge > 19 bp) auf die Anwesenheit weiterer *mprF* Mutationen und detektierten S337L nahe der suggestiven Assoziationsgrenze (LRT p -Wert 4.2×10^{-5}).

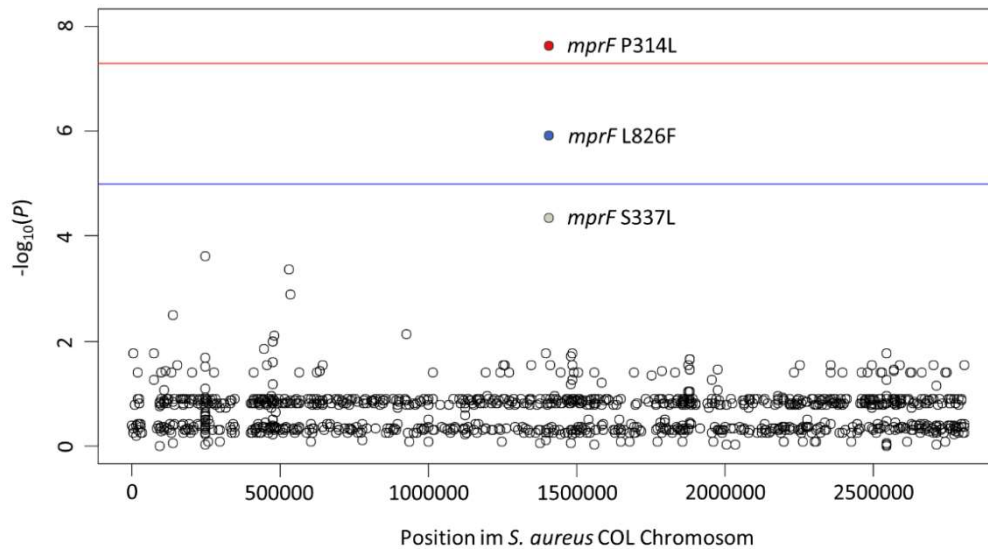


Abbildung 21 | Darstellung der Ergebnisse der DAP PLINK GWAS anhand eines Manhattan Plots. Die analysierten SNPs mit zugehörigen $-\log_{10} p$ -Werten sind gegen das Referenzgenom *S. aureus* COL (NC-002951) aufgetragen. Die rote Linie zeigt die genomweite Signifikanzgrenze ($-\log_{10} p$ -Wert = 5×10^{-8}), während die blaue Linie die suggestive Assoziationsgrenze darstellt ($-\log_{10} p$ -Wert = 1×10^{-5}). Zum Zweck der Veranschaulichung wurden SNPs mit einem $-\log_{10} p$ -Wert von 0 ausgeschlossen.

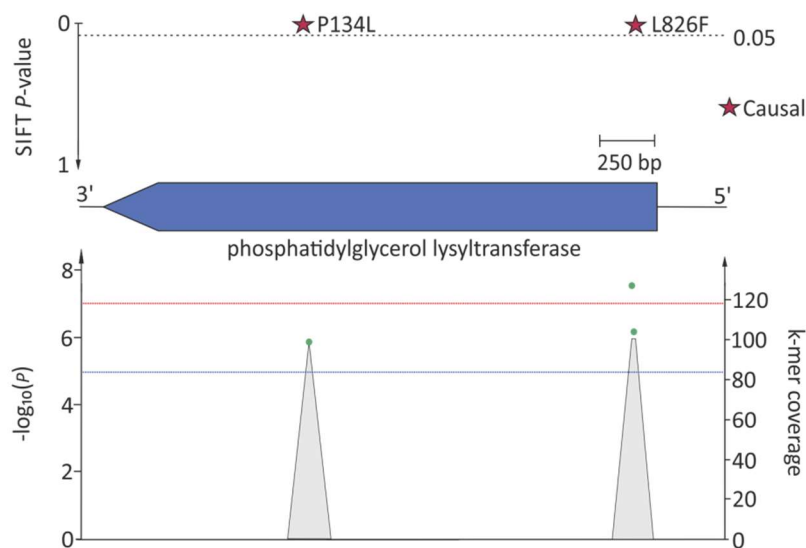


Abbildung 22 | Darstellung der Ergebnisse der DAP SEER GWAS. 187 signifikante K-mere wurden gegen das Referenzgenom *S. aureus* COL (NC-002951) Read-aligniert. Die K-mere decken zwei Bereiche von *mprF* ab (blaues Element). Die grauen Elemente zeigen die Tiefe der K-mer Abdeckung, während die grünen Punkte das Signifikanzniveau der K-mere widerspiegeln (LRT p -Wert). Kausale, nicht synonyme Mutationen mit entsprechenden SIFT p -Werten sind oberhalb des *mprF* Gens aufgeführt. Während die rote Linie die genomweite Signifikanzgrenze zeigt ($-\log_{10} p$ -Wert = 5×10^{-8}), stellt die blaue Linie die suggestive Assoziationsgrenze dar ($-\log_{10} p$ -Wert = 1×10^{-5}).

Um den Einfluss der identifizierten MprF ASS auf die Proteinfunktion zu bestimmen, nutzten wir SIFT [222]. Auf der Grundlage der Positionen und den physikalischen Eigenschaften von Aminosäuren kalkuliert der SIFT Algorithmus die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Substitution toleriert oder als schädlich gewertet wird. Sowohl für *mprF* P314L (SIFT *p*-Wert 0), als auch für L826F (SIFT *p*-Wert 0) und S337L (SIFT *p*-Wert 0,01) wird eine Beeinträchtigung der Proteinfunktion vorhergesagt (vergl. Abbildung 22).

Für eine übersichtliche Darstellung der GWAS Ergebnisse erstellten wir eine Heatmap, die die Verteilung der potentiell DAP-R assoziierten SNPs visualisiert (vergl. Abbildung 24). Bei der Betrachtung der *mprF* Mutationen wird deutlich, dass die SNPs primär in DAP-R *S. aureus* Isolaten auftreten und gleichmäßig über eine Bandbreite klonaler Linien verteilt sind. Des Weiteren fällt auf, dass MRSA und MSSA Isolate identische SNPs mit einer vergleichbaren Häufigkeit aufweisen (vergl. Abbildung 24). Dies steht im Gegensatz zu unseren Erwartungen, da ein vorangegangener Kontakt von MSSA Isolaten mit klinisch verabreichten Antibiotika unwahrscheinlich ist.

Da einige Isolate mit einer erhöhten DAP-MHK keine Mutation in *mprF* aufwiesen, suchten wir in den offenen Leserahmen (ORF, engl. *open reading frame*) von *mprF*, *cls2* (Cardiolipin-Synthase, SACOL_RS10875), *pgsA* (Phosphatidylglycerolphosphat Synthase, SACOL_RS06645), *rpoB* (β -Untereinheit der RNA Polymerase, SACOL_RS03050), *rpoC* (β' -Untereinheit der RNA Polymerase, SACOL_RS03055), (Transkriptionsregulator, SACOL_RS00120) und *yycG* (Sensor Histidinkinase, SACOL_RS00125) nach seltenen Mutationen (MAF < 1 %) bzw. Mutationen mit einer geringen Frequenz (MAF < 5 %). In zuvor veröffentlichten Studien wurde gezeigt, dass SNPs innerhalb dieser Loci die Entwicklung einer DAP Resistenz in *S. aureus* begünstigen [122, 124, 127, 132]. Final identifizierten wir für jedes DAP-R *S. aureus* Isolat eine Mutation in *mprF* (vergl. Abbildung 24). Die *mprF* Mutationen A315T, D317N, L432F und W424R³ wurden bis dato noch nicht beschrieben. Zusätzlich detektierten wir Mutationen innerhalb von *cls2* (S466T, I298T), *rpoB* (G200A, S464P, D471Y, Q468K/L, V871F), *rpoC* (V404I, G718R, R739C) und *yycG* (G223D, G233D, R281H, Y397C, M466T) (vergl. Abbildung 24). In *pgsA* und *yycF* konnten keine potentiell DAP-R assoziierten Mutationen identifiziert werden. *S. aureus* Isolate mit den *rpoB* ASS S464P, Q468K/L und D471Y zeigten eine phänotypische Resistenz gegenüber Rifampicin (RAM, MHK > 16 mg/L) (vergl. Abbildung 24).

Da vorangegangene Studien eine Korrelation zwischen dem VISA (Vancomycin intermediär empfindliche *S. aureus*⁴) und dem DAP-R Phänotyp bei *S. aureus* beschrieben, suchten wir in unserer Stammsammlung nach DAP-R Isolaten mit erhöhten VAN MHKs [119, 142]. In der Tat identifizierten wir zwei eng verwandte

³ W424C beschrieben in Berti *et al.*, 2015

⁴ VISA Definition nach dem *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 4 – 8 mg/L)

Isolate der gleichen Herkunft mit DAP- und VAN-MHKs von 8 bzw. > 16 mg/L. Beide Stämme zeigen eine Kombination von *mprF* P314L, *rpoC* R739C und *ycyG* M466T (vergl. Abbildung 24).

Methode	PLINK			SEER			Mesquite					Legende			
Referenz	NC-002951						NC-002951					DAP-S	DAP-S mit SNP		
												DAP-R	DAP-R mit SNP		
CDS	mprF			mprF			mprF	cls2	rpoB	rpoC	ycfF	MHK [mg/L] und klinischer Grenzwert nach			
Aminosäure Substitution	P314L	S337L	L826F	P314L	S337L	L826F						DAP R>1, S≤1	VAN R>2, S≤2	OXA R>2, S≤2	RAM R>0.5, S≤0.06
CC8												0,5	1	2	≤0,06
							S295L					4	2	≤0,25	≤0,5
												2	1	≤0,25	≤0,5
							L341S					0,5	1	2	≤0,06
							T345A		S464P			4	2	0,5	≤0,5
												4	1	1	>16
												0,5	1	>2	≤0,5
												0,5	1	0,25	≤0,06
							S295L				G223D	4	2	≤0,25	≤0,5
												2	2	≤0,25	≤0,5
												2	≤0,5	≤0,25	≤0,5
												0,5	1	0,25	≤0,06
												0,25	≤0,5	≤0,5	≤0,5
												4	≤0,5	≤0,25	≤0,5
												0,25	1	2	≤0,06
												0,5	1	0,25	≤0,06
						T345A			V404I		4	1	>2	≤0,5	
											0,5	≤1	>4	≤0,06	
ST7												2	≤0,5	≤0,25	≤0,5
												0,5	1	0,5	≤0,5
												0,5	1	0,5	≤0,06
												4	2	>2	≤0,5
												2	1	>2	≤0,5
												0,25	≤0,5	>2	≤0,5
												0,5	1	>2	≤0,5
									G200A			4	1	>2	≤0,5
												4	1	>2	≤0,5
												0,5	1	>2	≤0,06
												0,5	≤1	>4	≤0,25
												0,5	1	>2	≤0,06
							A315T					2	1	>2	≤0,5
							A315T		D471Y			1	1	>2	>16
							D317N.T345A				R281H	4	2	>2	≤0,5
												1	1	>2	≤0,5
												4	2	>2	≤0,5
												0,5	1	>2	≤0,06
							L432F.T472K					2	≤0,5	>2	≤0,5
												0,25	1	>2	≤0,5
									V871F		Y397C	2	2	>2	≤0,5
												4	1	>2	≤0,5
												0,5	≤0,5	>2	≤0,5
												2	≤0,5	>2	≤0,5
												2	1	>2	≤0,5
												0,25	≤1	>4	≤0,06
											G233D	8	1	>2	≤0,5
							L341S					4	1	≤0,25	≤0,5
												0,25	≤0,5	>2	≤0,5
												0,5	1	>2	≤0,06
												0,5	1	>2	≤0,06

Abbildung 23 | Heatmap von potentiell DAP-R assoziierten SNPs (Part 1). Beschreibung siehe Seite 79.

Methode	PLINK			SEER			Mesquite					Legende				
Referenz	NC-002951						NC-002951					DAP-S	DAP-S mit SNP			
CDS	mprF			mprF			mprF	cls2	rpoB	rpoC	yycF	MHK [mg/L] und klinischer Grenzwert nach				
Aminosäure Substitution	P314L	S337L	L826F	P314L	S337L	L826F						DAP R>1, S≤1	VAN R>2, S≤2	OXA R>2, S≤2	RAM R>0.5, S≤0.06	
CC15							P314A					0,5	1	1	≤0.06	
												4	1	≤0.25	≤0.5	
												4	1	≤0.25	≤0.5	
CC22												0,5	1	0,25	≤0.06	
												0,25	≤0.5	>2	≤0.5	
												4	2	>2	≤0.5	
												4	1	>2	≤0.5	
												0,25	≤0.5	>2	≤0.5	
												0,5	1	>2	≤0.06	
							S466P	Q468K				8	2	>2	>16	
												0,25	1	>2	0	
							L341S					2	1	>2	≤0.5	
												4	1	>2	≤0.5	
												0,5	1	>2	≤0.06	
												4	1	>2	≤0.5	
							L341S					0,25	≤1	>2	≤0.25	
												4	≤0.5	>2	≤0.5	
												0,25	≤0.5	>2	≤0.5	
												0,5	1	>2	≤0.5	
												4	1	>2	≤0.5	
												4	≤0.5	>2	≤0.5	
												4	2	>2	≤0.5	
												4	2	>2	≤0.5	
												8	>16	>2	≤0.5	
												8	>16	>2	≤0.5	
												4	1	1	>16	
												0,25	≤1	>2	≤0.25	
												0,25	≤1	>2	≤0.06	
								S295P		Q468L		4	2	>2	>16	
												0,25	≤0.5	>2	≤0.5	
												0,5	1	>2	≤0.5	
												0,5	≤0.5	>2	≤0.5	
												4	1	>2	≤0.5	
	CC45												0,25	≤0.5	>2	≤0.5
													0,25	1	0,5	≤0.5
								W424R	I298T				0,25	1	0,5	≤0.06
												4	1	≤0.25	≤0.5	
												2	1	≤0.25	≤0.5	
									G718R		2	2	≤0.25	≤0.5		
											0,5	1	1	≤0.06		

Abbildung 24 | Heatmap von potentiell DAP-R assoziierten SNPs (Part 2). In dem Kopfteil der Abbildung sind die Methoden aufgeführt, mit denen die Mutationen detektiert wurden. Zusätzlich sind die entsprechenden Loci und ASS aufgeführt (Referenzgenom *S. aureus* COL (NC-002951)). In der linken Spalte sind die klonalen Hintergründe der *S. aureus* Isolate anhand farbiger Schattierungen illustriert. Im Zentrum der Abbildung kennzeichnen hellrot schattierte Bereiche DAP-R Isolate, während hellgrün schattierte Bereiche DAP-S Isolate widerspiegeln. Dunkelrote bzw. dunkelgrüne Boxen kennzeichnen die Anwesenheit einer Mutation. Fett markierte ASS wurden noch nicht in der Literatur beschrieben. Auf der rechten Seite sind die MHKs von DAP, VAN, OXA und RAM für jedes Isolat aufgeführt. Blau schattierte Boxen weisen auf eine Unempfindlichkeit gegenüber dem jeweiligen Antibiotikum hin, während weiße Boxen Antibiotika-empfindliche Isolate kennzeichnen (EUCAST Grenzwerte (v6.0 2016)).

3.2.5 Identifikation von CPT-R assoziierten Mutationen

Im Anschluss an die Qualitätskontrolle und die PLINK GWAS verblieben 6.559 SNPs, deren Position (relativ zum Referenzgenom *S. aureus* 04-02981 (NC-017340)) und Signifikanzniveau (GC adjustierte $-\log_{10}$ p -Werte) in einem Manhattan Plot dargestellt wurden (vergl. Abbildung 25). Von diesen SNPs unterschritt *grlA* S80F (GC adjustierter p -Wert 9.16×10^{-6} ; DNA Topoisomerase IV Untereinheit A, SA2981_RS06930) die suggestive Assoziationsgrenze. Zusätzlich konnten wir knapp oberhalb der suggestiven Assoziationsgrenze die Mutation *gyrA* S84L (GC adjustierter p -Wert 3.55×10^{-5} ; DNA Gyrase Untereinheit A, Locus Tag SA2981_RS00030) detektieren. Dabei weisen alle *S. aureus* Isolate, die eine entsprechende Mutation in *gyrA* bzw. *grlA* Mutationen tragen (95 % der CPT-R und 42 % der CPT-S *S. aureus* Isolate), eine phänotypische Resistenz gegenüber Ciprofloxacin (CIP) auf.

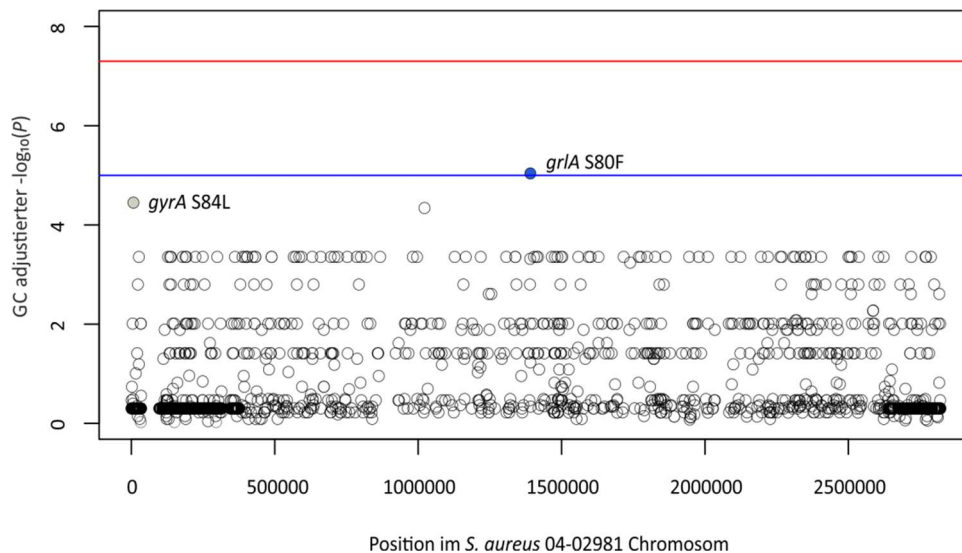


Abbildung 25 | Darstellung der Ergebnisse der CPT PLINK GWAS anhand eines Manhattan Plots. Die analysierten SNPs mit zugehörigen GC adjustierten $-\log_{10}$ p -Werten sind gegen das Referenzgenom *S. aureus* 04-02981 (NC-017340) aufgetragen. Die rote Linie illustriert die genomweite Signifikanzgrenze ($-\log_{10}$ p -Wert = 5×10^{-8}), während die blaue Linie die suggestive Assoziationsgrenze darstellt ($-\log_{10}$ p -Wert = 1×10^{-5}). Zum Zweck der Veranschaulichung wurden SNPs mit einem $-\log_{10}$ p -Wert von 0 ausgeschlossen.

Da MSSA Isolate kein *SCCmec* tragen und PLINK ausschließlich Kerngenomregionen erfassen kann, war eine Untersuchung dieser mobilen genetischen Elemente mittels PLINK nicht realisierbar. Folglich verwendeten wir das Tool SEER, welches K-mere verwendet und neben Mutationen und Rekombinationsereignissen auch Unterschiede im Gengehalt detektieren kann. Im Zuge der SEER Analyse untersuchten wir ca. 10 Millionen K-mere auf eine Assoziation zum CPT-R Phänotyp in *S. aureus*. Nach der Qualitätskontrolle (Wald p -Wert > 0, Wald $-\log_{10}$ p -Wert > 1×10^{-5} , β > 0, Länge > 19 bp) verblieben keine signifikanten K-mere (vergl. Abbildung 20 D). In folge dessen entschlossen wir uns, die Gensequenzen von *mecA* und den regulatorischen Elementen *mecI* und *mecR1*/ Δ *mecR1* aus den rekonstruierten *S. aureus*

Genomen zu extrahieren, um manuell nach potentiell CPT-R assoziierten Mutationen zu suchen. Da ein direkter Vergleich der gesamten Genkassette aufgrund der Diversität zwischen den bisher beschriebenen SCCmec Typen nur schwer umsetzbar war, fokussierten wir uns auf die Untersuchung der oben genannten Kernelemente (vergl. Abbildung 26 und Abbildung 27). In der Tat konnten wir innerhalb von *mecA* und den regulatorischen Genen *mecI*, Δ *mecRI* und *mecRI* eine Vielzahl von potentiell CPT-R assoziierten Mutationen detektieren, die überwiegend in Abhängigkeit des CC bzw. ST auftraten (vergl. Abbildung 26 und Abbildung 27).

Interessanterweise fanden wir einige *S. aureus* Isolate, die weder in *mecA*, noch innerhalb der regulatorischen Elemente Mutationen aufwiesen. Dies betrifft insbesondere die *S. aureus* Isolate mit dem ST 225. Aufgrund dessen suchten wir für diese Isolate nach Mutationen in *pbp1*, *pbp2*, *pbp3*, *pbp4*, *gdpP*, *arcB*, *pp2C*, *clpX* und *rho*, da diese Proteine möglicherweise in die Bindung von CPT involviert sind, oder eine funktionelle Rolle bei der Entwicklung der β -Laktam-Resistenz spielen. Mit Ausnahme von *pbp1* (P360S) und *pbp2* (A382T), die in dem *S. aureus* Isolat 12-02627 detektiert wurden (CPT-MHK 3 mg/L), konnten jedoch keine Mutationen detektiert werden.

Legende							mecA										mecI	mecR1	ΔmecRI	
CPT-S	CPT-R	CDS abwesend	CPT-S mit SNP	CPT-R mit SNP																
CC/ST		SCCmec	CPT R/S	CPT MHK (MW)	OXA	OXA MHK	D139N	N146K	E150K	N204K	T235I	E239K	E239R	G246E	K281R	E447K	Q68*	R69*	P50S	K275I
ST398	398	V(5C2&5)	S	0,5	R	8														
CC30	30	IV(2B)	R	2,0	R	32														
	30	abwesend	S	0,1	S	1														
	30	abwesend	S	0,7	S	1														
	30	abwesend	S	0,2	S	1														
	30	IV(2B)	S	0,8	R	16														
	30	abwesend	S	0,2	S	1														
CC8	8	IV(2B)	R	2,0	R	64														
	113	IV(2B)	R	6,0	R	512														
	8	IV(2B)	S	0,5	R	32														
	8	IV(2B)	S	1,0	R	16														
	239	III(3A)	R	4,0	R	512														
	239	III(3A)	S	0,8	R	128														
	239	III(3A)	R	2,0	R	512														
	239	III(3A)	R	3,3	R	1024														
	239	III(3A)	R	4,0	R	1024														
	239	abwesend	S	1,0	S	4														
	239	abwesend	S	0,3	S	1														
	1465	III(3A)	R	4,0	R	512														
	239	III(3A)	R	4,0	R	1024														
	239	III(3A)	R	2,0	R	512														
	239	III(3A)	R	4,0	R	1024														
CC22	22	abwesend	S	0,3	S	1														
	22	abwesend	S	0,3	S	1														
	22	abwesend	S	0,2	S	1														
	22	abwesend	S	0,2	S	1														
	22	abwesend	S	0,3	S	1														
	22	abwesend	S	0,3	S	1														
	22	abwesend	S	0,3	S	1														
	22	IV(2B)	S	1,0	R	34														
	22	IV(2B)	R	1,8	R	128														
	22	IV(2B)	R	2,0	R	128														
	22	IV(2B)	S	1,0	R	128														
	22	IV(2B)	R	2,0	R	64														
	22	IV(2B)	S	0,9	R	32														
	22	IV(2B)	R	1,8	R	256														
	22	IV(2B)	R	2,0	R	1024														
	22	IV(2B)	R	1,8	R	128														
	22	IV(2B)	R	2,0	R	128														
	22	IV(2B)	R	1,6	R	128														
	22	IV(2B)	R	2,0	R	512														
	22	IV(2B)	R	1,8	R	128														

Abbildung 26 | Heatmap von potentiell CPT-R assoziierten Mutationen in den SCCmec Kernelementen (Part 1).
Beschreibung siehe Seite 83.

Legende							mecA										med	mecR1	ΔmecRI
CPT-S	CPT-R	CDS abwesend	CPT-S mit SNP	CPT-R mit SNP															
CC/ST	SCCmec	CPT R/S	CPT MHK (MW)	OXA	OXA MHK	D139N	N146K	E150K	N204K	T235I	E239K	E239R	G246E	K281R	E447K	Q68*	R69*	P50S	K275I
CC5	225	II(2A)	S	0,5	R	>4													
	225	II(2A)	S	1,0	R	>4													
	225	II(2A)	R	2,0	R	64													
	unknown	II(2A)	S	0,5	R	32													
	225	II(2A)	S	0,8	R	8													
	225	II(2A)	S	1,0	R	128													
	225	II(2A)	S	1,0	R	32													
	225	II(2A)	R	2,0	R	64													
	225	II(2A)	S	1,0	R	128													
	225	II(2A)	R	2,0	R	256													
	225	II(2A)	R	1,8	R	128													
	225	abwesend	S	0,3	S	1													
	225	II(2A)	R	3,0	R	1024													
	225	II(2A)	R	2,0	R	1024													
	5	IV(2B)	S	0,8	R	32													
	5	abwesend	S	0,2	S	1													
	5	I(1B)	S	0,8	R	16													
	5	abwesend	S	0,8	S	1													
	5	IV(2B)	S	0,8	R	>4													
	146	abwesend	S	0,2	S	1													
	5	abwesend	S	0,1	S	1													
	5	abwesend	S	0,2	S	1													
	5	abwesend	S	0,2	S	1													
	5	abwesend	S	0,1	S	1													
	5	I(1B)	S	0,5	R	4													
	5	I(1B)	S	0,4	(S)	1													
	5	I(1B)	S	0,8	R	32													
	228	abwesend	S	0,8	S	1													
	228	I(1B)*	R	4,0	R	512													
	228	I(1B)	R	3,0	R	1024													
	228	I(1B)	R	6,0	R	1024													
	228	I(1B)	R	4,0	R	1024													
	228	I(1B)	R	2,0	R	1024													
	228	I(1B)	R	2,3	R	512													
	228	I(1B)	R	2,3	R	1024													
	228	I(1B)	R	2,0	R	512													
	228	I(1B)	R	3,0	R	1024													
	228	I(1B)	R	3,0	R	1024													
	111	I(1B)	R	3,7	R	1024													
	111	I(1B)	R	4,0	R	1024													
	111	I(1B)	R	4,0	R	1024													
	111	I(1B)	R	3,3	R	1024													
	111	I(1B)	R	4,0	R	1024													
	111	I(1B)	R	3,7	R	1024													
	111	I(1B)	R	3,3	R	1024													

Abbildung 27 | Heatmap von potentiell CPT-R assoziierten Mutationen in den SCCmec Kernelementen (Part 2). In der linken Spalte sind die zugeordneten STs und CCs von 87 *S. aureus* Isolaten farblich dargestellt. Fett markierte STs kennzeichnen Isolate, die vor dem Jahr 2012 isoliert wurden. Oberhalb sind die ASS in den entsprechenden SCCmec Genelementen gezeigt. CPT-R und CPT-S *S. aureus* Isolate sind als rot- bzw. grün-schattierte Boxen gekennzeichnet. Dunkel schattierte rote bzw. grüne Boxen weisen auf die Anwesenheit einer Mutation hin, während grau schattierte Bereiche auf die Abwesenheit eines genetischen Elements hindeuten. (S) = FOX MHK von 4 mg/L. MW = Mittelwert. (EUCAST v6.0 2016, CPT-S ≤ 1 mg/L, CPT-R > 1 mg/L). *SCCmec Typ I(1B) mit einer Abdeckung von 81.4 %.

3.3 Genetische Manipulation von *S. aureus*

Im Rahmen der Mesquite-Analysen von *mprF* detektierten wir in einigen DAP-R *S. aureus* Isolaten *low-frequency* Varianten, die bis dato noch nicht beschrieben wurden. Hierzu gehören die ASS A315T, D317N, L432F und W424R (vergl. Abbildung 23 und Abbildung 24). Um den Einfluss der Mutation auf die Entstehung einer DAP-Resistenz in *S. aureus* zu untersuchen, generierten wir *S. aureus* Substitutionsmutanten nach der in 2.2.3.4 beschriebenen Vorgehensweise. Da alle Mutationen, bis auf W424R, in Kombination mit weiteren *mprF* Mutationen auftreten, generierten wir sowohl Einzel- als auch Doppelmutanten (vergl. Tabelle 17).

Tabelle 17 | Auflistung der in dieser Arbeit etablierten *mprF* *S. aureus* Substitutionsmutanten.

Wirt	Vektor	<i>mprF</i> ASS
SA113Δ <i>mprF</i>	pRB474- <i>mprF</i>	W424R
SA113Δ <i>mprF</i>	pRB474- <i>mprF</i>	A315T/P314L ¹
SA113Δ <i>mprF</i>	pRB474- <i>mprF</i>	L432F/T472K ¹
SA113Δ <i>mprF</i>	pRB474- <i>mprF</i>	D317N/T345A ¹

¹ Einzel- als auch Doppelmutanten

Obwohl der *Hae*II Restriktionsverdau und die Sanger-Sequenzierung die Anwesenheit des pRB474-*mprF* Plasmids bzw. die Anwesenheit der *mprF*-Mutationen bestätigte (Daten nicht gezeigt), weisen alle Transformanten eine DAP-MHK auf, die in etwa der DAP-MHK der *mprF*-Deletionsmutante (SA113Δ*mprF*) entspricht (vergl. Abbildung 28). Im Gegensatz dazu zeigt das SA113Δ*mprF* Isolat mit dem pRB474-*mprF* Wildtyp (WT) Plasmid eine erhöhte DAP-MHK. Eine anschließende MiSeq-Sequenzierung zeigte, dass im Rahmen der SDM ein MGE (*IS4-like element ISVsa5 family transposase*) in die Sequenz von *mprF* integrierte (vergl. Abbildung 29).

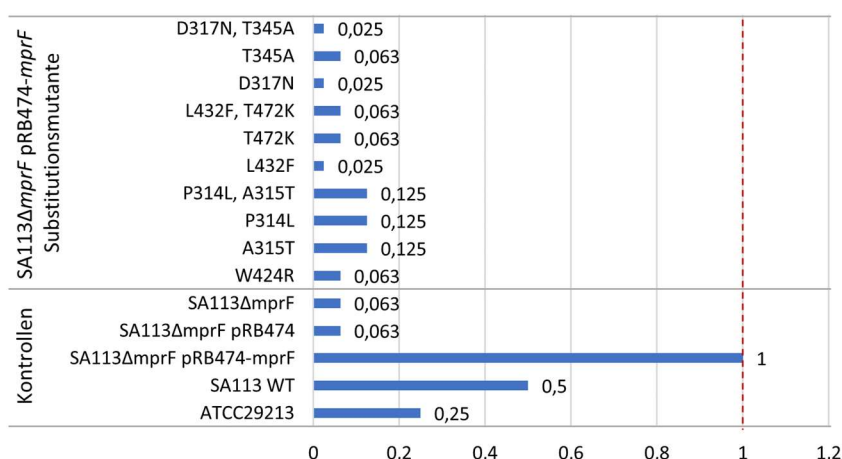


Abbildung 28 | Darstellung der DAP-MHK von *S. aureus* Substitutionsmutanten und Kontrollen. Die Zahlen geben die MBV DAP-MHK der *S. aureus* Isolate an. ATCC29213 diente der Überprüfung der in Eigenherstellung produzierten DAP-MHK-Platten. Die senkrecht verlaufende rote Linie gibt den EUCAST definierten Grenzwert für DAP an (EUCAST v6.0 2016, DAP-S ≤ 1 mg/L, DAP-R > 1 mg/L).

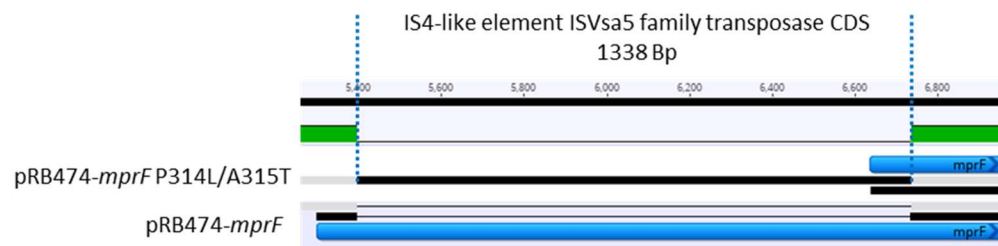


Abbildung 29 | Darstellung der IS4-ähnlichen Transposase aus pRB474-*mprF* P314L/A315T. Die obere Sequenz zeigt einen Teilausschnitt von pRB474-*mprF* P314L/A315T, in den die IS4-ähnliche Transposase integrierte (blau gepunktete Linie). Unten ist die entsprechende Sequenz des WT Plasmids pRB474-*mprF* dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Kommerzielle Testsysteme zur Bestimmung der Empfindlichkeit von *S. aureus* gegenüber DAP generieren valide Ergebnisse

Das am Robert-Koch-Institut (RKI) angegliederte NRZ für Staphylokokken und Enterokokken verzeichnet seit 2008 einen stetigen Anstieg von *S. aureus* Isolaten mit einer Resistenz gegenüber DAP (0,49 % in 2008 – 7,1 % in 2017) (vergl. Abbildung 15). Diese Entwicklung steht im Gegensatz zu den Ergebnissen einer Studie, welche konstant niedrige DAP-R Raten über einen Zeitraum von 8 Jahren (2005 (0,02 %) – 2012 (0,04 %)) anhand einer weltweiten Stammkollektion dokumentierte [116]. Dieser Widerspruch geht vermutlich u.a. auf die Funktion des RKI als NRZ zurück, da klinische Laboratorien und Kliniken vom RKI aktiv dazu aufgerufen werden, DAP-R *S. aureus* Isolate einzusenden. Trotz dieses Einflusses sind gerade die gestiegenen Einsendezahlen von DAP-R MSSA Isolaten auffällig. Während in 2008 noch 20 % aller DAP-R *S. aureus* Einsendungen als MSSA identifiziert wurden, sind es 2017 knapp 70 % (vergl. Abbildung 15). Bereits in vorhergehenden Studien wurden DAP-R MSSA Isolate aus Patienten beschrieben, welche im Vorfeld nicht mit DAP oder Glykopeptid-Antibiotika behandelt worden waren [223]. Dieser Umstand lässt vermuten, dass sich die Resistenz gegenüber DAP in *S. aureus* ohne die Verabreichung entsprechender Antibiotika in der Bevölkerung entwickeln kann. Eine mögliche Erklärung könnte in dem System der angeborenen Immunantwort liegen. So postulierten Mishra *et al.*, dass die endogene Exposition von *S. aureus* gegenüber bestimmten kationischen Wirtspeptiden zu einer Selektion von Stämmen mit einer intrinsisch höheren DAP-MHK führen kann [224].

Aufgrund des vermehrten Einsatzes von DAP als *Ultima Ratio* ist es für klinische Laboratorien entscheidend, auf zuverlässige und schnelle Empfindlichkeitstests zurückgreifen zu können, um Klinikern präzise Behandlungsentscheidungen zu ermöglichen und Kontrollpraktiken in die Laborroutine zu implementieren. Dieser Teil der Studie zielte darauf ab, die Zuverlässigkeit kommerziell erhältlicher Testsysteme zur Bestimmung des DAP-Phänotyps bei *S. aureus* zu überprüfen und klinische Laboratorien bei der Interpretation der Ergebnisse zu unterstützen.

Basierend auf der in dieser Arbeit etablierten *S. aureus* Stammkollektion konnten wir eine hohe Konkordanz zwischen den überprüften Testsystemen (M.I.C. Evaluator®, Etest®, Daptomycin MIC test strip®, VITEK®2) und der MBV Referenzmethode demonstrieren. Dies gilt sowohl für MRSA als auch MSSA Isolate (vergl. Abbildung 16 und Tabelle 16). Trotz der hohen Konkordanz tendieren die MHK Werte des VITEK®2 Systems und der MHK Teststreifen von Thermo Fisher Scientific (M.I.C. Evaluator®) sowie von Liofilchem (Daptomycin MIC test strip®) dazu, in Relation zu der MBV Referenzmethode erhöht auszufallen (vergl. Abbildung 16). Folglich besteht die Gefahr, dass Resistenzentwicklungen überschätzt

werden und wirksame Therapieoptionen verloren gehen. In Kliniken oder medizinischen Einrichtungen sind jedoch solche Fälle von besonderer Bedeutung, in denen auftretende Resistenzen nicht erkannt werden. In Übereinstimmung mit Untersuchungen von Jorgensen und Crawford beobachteten wir bei den MHK Teststreifen von bioMérieux eine leichte Tendenz zur Unterschätzung des DAP Resistenzphänotyps (vergl. Abbildung 16) [225]. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Studien, in denen der Etest® erhöhte MHK Werte generierte [226, 227]. Da die Wirksamkeit von DAP auf der Anwesenheit von Ca^{2+} beruht, ist es möglich, dass die konträren Resultate und Abweichungen auf variierende Kalzium-Konzentrationen zurückzuführen sind, welche in Abhängigkeit der verwendeten Medien oder Chargen stark abweichen können [217, 228]. Neben diesem Einflussfaktor haben Friedrich *et al.* gezeigt, dass selbst zwischen MHK-Teststreifen des gleichen Herstellers chargenbedingte MHK-Diskrepanzen auftreten können [229].

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Interpretation des DAP Phänotyps für *S. aureus* Isolate insbesondere dann erschwert ist, wenn diese eine DAP-MHK nahe dem EUCAST definierten Grenzwert aufweisen. So detektierten wir für ein einzelnes *S. aureus* Isolat mit einer MBV DAP-MHK von 1 mg/L, insgesamt 3 falsch-negative Ergebnisse (vergl. Anhang 1). Zu dieser Problematik trägt, neben den bereits genannten Faktoren, vor allem die Abwesenheit einer intermediären Kategorie bei, welche die Einteilung in ausschließlich falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse erlaubt [225]. Aus diesem Grund sollten klinische Laboratorien ein Referenzlabor mit der Überprüfung der DAP-MHK beauftragen, sofern grenzwertig resistente/sensible *S. aureus* Isolate detektiert wurden. Trotz der aufgeführten Problematiken zeigen unsere Ergebnisse, dass klinische Laboratorien nur einem begrenzten Risiko ausgesetzt sind, entsprechende Resistenzentwicklung bei *S. aureus* zu übersehen, solange handelsübliche Testsysteme gemäß den Empfehlungen der Hersteller eingesetzt werden [212].

Interessanterweise detektierten wir in unserer Stammsammlung sowohl DAP-R MRSA (15 %) als auch DAP-R MSSA (17 %) Isolate mit erhöhten VAN-MHKs (2 - 4 mg/L). Stefani *et al.* beschrieben bereits in einer früheren Studie das Auftreten von Kreuzresistenzen zwischen Glykopeptid-Antibiotika und DAP, die mit komplexen genetischen Entwicklungen in Verbindung gebracht wurden [230]. Allerdings standen bisher MRSA Isolate im Fokus der Untersuchungen, deren Resistenzentwicklung möglicherweise mit früheren Antibiotika-Behandlungen verbunden ist. In dieser Hinsicht war unsere Studie jedoch limitiert, da uns keine Behandlungsinformationen für die untersuchten *S. aureus* Isolate vorlagen.

4.2 GWAS zur Detektion Resistenz-vermittelnder Mutationen in *S. aureus* – Chancen und Limitationen eines leistungsfähigen Tools

4.2.1 Detektion potentiell DAP-R assoziierter Mutationen

In dem Jahr 2014 demonstrierten Farhat *et al.* eine Strategie zur Etablierung bakterieller Stammkollektionen, die dem Zweck diene, die negativen Auswirkungen von Populationsstrukturen auf die Erfolge einer GWAS zu minimieren [231]. Das Grundkonzept dieser Strategie basiert darauf, nahe verwandte Isolate mit unterschiedlichen Phänotypen zu paaren. Dabei werden die Verwandtschaftsverhältnisse zunächst durch klassische Typisiermethoden abgeleitet und nachfolgend anhand phylogenetischer Analysen rekonstruiert [231]. In Anlehnung an dieses Konzept etablierten wir eine Stammkollektion von klinischen *S. aureus* Isolaten zur Untersuchung des DAP-R Phänotyps. Hierfür suchten wir nach Fallisolaten, deren Charakteristika (MLST-Typ, Isolationsdatum und geographische Herkunft) mit denen von Kontrollisolaten in Übereinstimmung gebracht werden konnten (vergl. 2.1.12.2 und Anhang 2). Da Mutationen, die unabhängig vom klonalen Hintergrund auftreten (konvergente Mutationen), als starker Indikator für eine positive Selektion gelten (z.B. Selektionsdruck durch Antibiotikagebrauch), implementierten wir in die Stammkollektion bewusst Isolate diverser STs bzw. CCs [232]. Die anschließende Rekonstruktion der Verwandtschaftsverhältnisse verdeutlichte, dass wir aufgrund der angewandten Strategie eine ausgesprochen homogene Verteilung der DAP-Resistenzphänotypen erreichten (vergl. Abbildung 17). Folglich reduzierten wir nicht nur die Wahrscheinlichkeit von Populationsstrukturen falsch-positive Assoziationen zu generieren, sondern generierten gleichzeitig eine Stammkollektion von klinischen *S. aureus* Isolaten, die aufgrund ihrer Größe und Diversität eine bisher einzigartige Gelegenheit bot, die Grundlagen der DAP-Resistenz in *S. aureus* zu erforschen.

Obwohl die ausgewogene Stammsammlung bereits intrinsisch systematischen Verzerrungen vorbeugt, inkludierten wir in die PLINK Assoziationstestung *hierBAPS* Subcluster, deren Verwendung sich bereits in vorhergehenden Studien als effektives Mittel erwiesen hat, um dem Effekt der *population stratification* entgegenzuwirken [179, 183]. So verwendeten Chewapreecha *et al.* in einer Assoziationsstudie *BAPS* abgeleitete Subcluster, um den genetischen Hintergrund zweier *Streptococcus pneumoniae* Populationen in der Assoziationstestung zu berücksichtigen [179]. Auch Chen *et al.* konnten anhand einer Kollektion von 123 *Mycobacterium tuberculosis* Isolaten zeigen, dass eine Assoziationstestung auf der Grundlage von Subpopulationen zu einer positiven Beeinflussung der Qualitätsparameter (λ_{GC}) führte [183]. Trotz der in der PLINK GWAS berücksichtigten Subcluster deutet sowohl der konstruierte Q-Q Plot als auch der ermittelte λ_{GC} auf eine leichte Verzerrung der Ergebnisse hin (vergl. Abbildung 19A und 2.2.4.3.2). Wir vermuteten, dass diese Verzerrung auf die Isolate mit dem ST 78 und ST 101 zurückzuführen ist, da die

phylogenetischen Cluster ausschließlich DAP-R Isolate umfassen (vergl. Abbildung 17). Folglich entfernten wir die entsprechenden Isolate aus der Analyse, was zu einer Verbesserung der Qualitätsparameter führte (vergl. Abbildung 19B). Diese Beobachtungen unterstützen das Konzept der gepaarten Isolate von Farhat *et al.*, da offenbar selbst kleine Subcluster, die ausschließlich Stämme mit dem Phänotyp von Interesse tragen, zu einer negativen Beeinflussung der Resultate führen können [231]. Auf Grundlage dieser Beobachtungen führten wir die SEER Analyse unter Ausschluss der Isolate mit dem ST 78 und ST 101 durch (vergl. 3.2.3). Um Populationsstrukturen aus bakteriellen Populationen abzuleiten, nutzt das Tool Distanzmatrizen und das Prinzip der MDS [176]. Dieses Verfahren ist analog zu der in humanen Assoziationsstudien genutzten Hauptkomponentenanalyse (engl. *Principal Component Analysis* (PCA)), besitzt allerdings den Vorteil, dass die Analyse keine Identifikation von SNPs voraussetzt, sondern direkt auf der Grundlage der gezählten K-mere erfolgt [176, 233]. Basierend auf der generierten Distanzmatrix konnten die Populationsstrukturen in der SEER Assoziationsstudie effektiv berücksichtigt werden (vergl. Abbildung 19B).

Wie bereits erwartet, identifizierten wir in den PLINK und SEER Assoziationsstudien Mutationen in *mprF*, die signifikant mit dem DAP-R Phänotyp assoziiert wurden (P314L und L826F; vergl. Abbildung 21 und Abbildung 22). Da die entsprechenden ASS bereits in vorhergehenden Studien als ursächlich für die Ausbildung einer DAP-Resistenz in *S. aureus* beschrieben wurden, galt die Detektion der Mutationen als *Proof of Concept* der angewandten Methoden. Obwohl nicht signifikant, detektierten wir im Rahmen beider Analysen zusätzlich die in der Literatur bereits beschriebene Mutation *mprF* S337L (nahe der suggestiven Assoziationsgrenze). Bei der Betrachtung der Mutationen fällt auf, dass diese zwar vermehrt mit einigen klonalen Linien assoziiert sind, insgesamt jedoch in diversen CCs bzw. STs vertreten sind (vergl. Abbildung 24 und Abbildung 23). Diese Verteilung ist charakteristisch für eine konvergente Evolution und unterstützt die besondere Bedeutung von *mprF* an der Ausbildung einer DAP-Resistenz in klinischen *S. aureus* Isolaten [232]. Die Tendenz von genetischen Varianten vermehrt mit bestimmten klonalen Linien assoziiert zu sein verdeutlicht gleichzeitig, dass die Zusammensetzung einer Stammkollektion zu einer starken Beeinflussung der Signifikanzniveaus von genetischen Varianten führt und somit den Ausgang einer GWAS maßgeblich beeinflusst. Auffällig ist zudem, dass in Abhängigkeit der verwendeten Methode (PLINK vs. SEER) eine Verschiebung der Signifikanzniveaus von *mprF* P314L und L826F auftritt (vergl. Abbildung 21 und Abbildung 22). Diese Diskrepanz ist durch den Umstand begründet, dass die Mutation P314L in DAP-R Isolaten des CC 45 mittels SEER nicht detektiert werden konnte. In diesen Fällen war die Anwesenheit Linien-spezifischer genetischer Varianten dafür verantwortlich, dass K-mere in Sequenzeinheiten mit geringerer Frequenz gesplittet wurden, wodurch das Signifikanz-Niveau der entsprechenden K-mere beeinflusst wurde [163].

Die Mutation *mprF* P314L wurde ursprünglich im Rahmen einer *in vitro* Studie von Friedman *et al.* beschrieben [127]. Schon damals postulierten die Autoren, dass die Mutation möglicherweise zu einer verminderten Empfindlichkeit von *S. aureus* gegenüber DAP führen kann [127]. Einige Jahre später wurde die Vermutung durch die Arbeitsgruppe um Mehta *et al.* experimentell bestätigt, welche DAP-R assoziierte Mutationen anhand isogener Paarungen von klinischen *S. aureus* Isolaten untersuchten [135]. Die Mutation *mprF* P314L ist, genau wie S337L, in einer der sogenannten *hotspot* Regionen der bi-funktionalen Domäne von *mprF* lokalisiert, welche sowohl in die Synthese als auch Translokation von L-PG involviert ist [121]. Es wird vermutet, dass Mutationen in diesen Regionen mit einem Funktionsgewinn des Proteins einhergehen und damit zu einer erhöhten Produktion als auch Translokation des positiv geladenen L-PG Membranlipids führen [234, 235]. Selbige Vermutung gilt für die Mutation L826F, welche in der C-terminalen Synthase-Domäne von MprF lokalisiert ist [124]. Der Funktionsgewinn des Proteins würde im Gegenzug zu einer gesteigerten positiven Oberflächenladung der Bakterien führen und damit zur ladungsbedingten Abstoßung des Ca^{2+} komplexierten DAP [113]. Diese Annahme wurde durch Untersuchungen unterstützt, die diverse *mprF* Mutationen mit einer erhöhten positiven Ladung der bakteriellen Oberfläche assoziierten [141, 236].

Da wir in mehreren *S. aureus* Isolaten keine der oben beschriebenen *mprF* Varianten detektierten (vergl. Abbildung 23 und Abbildung 24), suchten wir in unserem Datenset anhand nachfolgender *in silico* (Mesquite-) Analysen nach selten auftretenden *mprF* Mutationen (vergl. 2.2.4.4). Diese sogenannten *low-frequency* Varianten können mittels GWAS nicht detektiert werden, da sie durch die den Assoziationsstudien vorgeschalteten Qualitätsfilter verworfen werden (vergl. 2.2.4.3.2). Auf der Grundlage dieser Untersuchungen war es uns möglich, für jedes DAP-R *S. aureus* Isolat mindestens eine nicht-synonyme ASS in *mprF* nachzuweisen (vergl. Abbildung 23 und Abbildung 24). Von den insgesamt 13 unterschiedlichen *mprF* Mutationen, die wir in unserer Population identifizierten, sind 4 Mutationen gegenwärtig noch nicht beschrieben (vergl. 3.2.4). Folglich muss die Relevanz der entsprechenden Mutationen in anschließenden Untersuchungen experimentell validiert werden (z.B. durch die Erzeugung von *S. aureus* Substitutionsmutanten; siehe unten). Von besonderem Interesse ist die Tatsache, dass wir in keinem der *S. aureus* Isolate eine Akkumulation von *mprF* SNPs beobachten konnten (vergl. Abbildung 23 und Abbildung 24). Aufgrund dessen vermuten wir, dass die Ausbildung mehrerer SNPs in *mprF* statt mit einem Aktivitätsgewinn, mit einem Aktivitätsverlust des Proteins einhergeht und folglich in Gegenwart von DAP zu einem Selektionsnachteil führt. Diese Vermutung wird durch aktuelle Studien von Yang *et al.* unterstützt, die anhand von Labor-generierten *S. aureus* Mutanten zeigten, dass die gleichzeitige Anwesenheit von *mprF* Mutationen zu einer reduzierten DAP-MHK, einer reduzierten positiven Oberflächenladung und einer reduzierten L-PG Synthese führt [237].

Im Rahmen der Mesquite-Analysen suchten wir nicht nur in *mprF*, sondern auch in bekannten Kandidatengen (*pgsA*, *cls2*, *yycF/G* und *rpoB/C*) nach *low-frequency* Varianten, die potentiell mit dem DAP-R Phänotyp in *S. aureus* korrelieren (vergl. Abbildung 23 und Abbildung 24). In der Tat detektierten wir im Rahmen dieser Untersuchungen Mutationen in *cls2*, *yycF*, *rpoB* und *rpoC*, die möglicherweise mit erhöhten DAP-MHKs in Verbindung stehen (vergl. Abbildung 23 und Abbildung 24). Da DAP-R assoziierte Mutationen in *pgsA* bisher nur im Rahmen von *in vitro* Studien beschrieben wurden und auch wir in der vorliegenden Studie keine Mutationen in den entsprechenden ORFs identifizierten, muss die Bedeutung des Proteins an der Ausbildung einer DAP-Resistenz in klinischen *S. aureus* Isolaten kritisch hinterfragt werden [124, 238]. Im Gegensatz dazu detektierten wir in *cls2* Mutationen, die *bis dato* noch nicht beschrieben wurden und potentiell mit dem DAP-R Phänotyp in *S. aureus* korrelieren (vergl. Abbildung 24). Von besonderem Interesse ist ein Isolat aus dem CC 22 mit einer DAP-MHK von 8 mg/L, welches eine Kombination von *cls2* S466P, *mprF* S337L und *rpoB* Q468K aufweist (vergl. Abbildung 24). Bereits in dem Jahr 2011 zeigten Peleg *et al.*, dass Mutationen in *cls2* mit erhöhten DAP-MHKs korrelieren [124]. Die Autoren vermuteten, dass die genetischen Varianten mit einer Beeinträchtigung der Proteinfunktion einhergehen und ein dadurch reduzierter Cardiolipin-Gehalt der bakteriellen Zellmembran zu einer ladungsbedingten Abstoßung des Ca²⁺-komplexierten DAP oder einer reduzierten Bindungseffizienz des Lipopeptids führt [124]. Des Weiteren wurde die Bedeutung von *cls2* bei der Etablierung einer DAP-Resistenz durch Untersuchungen an klinischen *Enterococcus* Isolaten unterstützt, in denen *cls2* Mutationen mit erhöhten DAP-MHKs in Verbindung gebracht wurden [239, 240]. Im Gegensatz dazu halten wir eine Beteiligung der Mutation *rpoB* Q468K an der Ausbildung einer DAP-Resistenz für unwahrscheinlich. Diese Annahme geht auf Ergebnisse bereits veröffentlichter Studien zurück, in denen die Autoren zeigten, dass die *rpoB* Mutationen S464P, Q468K/L und D471N in dem Cluster I der RAM Bindestelle von *rpoB* liegen und eine Resistenz gegenüber selbigem Antibiotikum vermitteln [241]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen weisen alle *S. aureus* Isolate aus unserer Population mit einer entsprechenden Mutation eine RAM MHK > 16 mg/L auf (vergl. Abbildung 24 und Abbildung 23) [241]. Interessanterweise detektierten wir zusätzlich zwei Isolate (CC 22) mit einer Kombination von *mprF* L826F, *rpoC* R739C und *yycF* M466T, die eine DAP- und VAN-MHK von 8 mg/L bzw. > 16 mg/L zeigten (vergl. Abbildung 24). In bereits publizierten Studien wurden unterschiedliche Expressionsprofile des *yycFG* Regulationssystems und Mutationen in den entsprechenden ORFs mit dem DAP-R Phänotyp in *S. aureus* und, im Speziellen, mit dickeren Zellwänden und ladungsbedingten Veränderungen der bakteriellen Zellwand in Verbindung gebracht [124, 125, 127, 139]. Das Phänomen der verdickten Zellwand ist nicht universell bei DAP-R *S. aureus* zu beobachten, gilt jedoch als typisches Merkmal von VISA Isolaten [242]. Aus diesem Grund konnten wir und weitere Forschungsgruppen eine Korrelation zwischen dem DAP-R und dem VISA-Phänotyp aufzeigen (vergl. Abbildung 24) [142, 143, 236, 242-244]. Obwohl DAP im Gegensatz zu VAN keine Bestandteile des Peptidoglykans bindet (VAN bindet

endständige L-Lysin-D-Alanyl-D-Alanin-Gruppen des Mureins), könnte das erhöhte Molekulargewicht von DAP dazu beitragen, eine Penetration der bakteriellen Zellmembran zu erschweren [132]. Aufgrund des Vorkommens solcher kreuzresistenter Isolate, sollten *S. aureus* Isolate aus erfolglos verlaufenen Therapien mit VAN auch auf das Vorliegen einer DAP-Resistenz untersucht werden (im Speziellen bei Hochrisikopatienten) [72]. Da in diesem Fall jedoch keine Daten über den Therapieverlauf an das RKI übermittelt wurden, können wir keine Aussage darüber treffen, ob die Mutationen in Folge der Gabe von VAN oder DAP entstanden.

Anhand dieser Untersuchungen konnten wir zeigen, dass prominente Mutationen in *mprF* in der Regel mit DAP MHKs von ≤ 4 mg/L assoziiert sind (vergl. Abbildung 24 und Abbildung 23). Erst mit der Akkumulation weiterer (*low-frequency*) Mutationen in bekannten Kandidatengenen scheinen additive Effekte zu greifen, die mit einer Steigerung der DAP-MHK einhergehen (vergl. Abbildung 24 und Abbildung 23). Inwieweit die in unserer Studie erstmals detektierten *cls2*, *yycF*, *rpoB* und *rpoC* Mutationen tatsächlich eine Rolle bei der Entwicklung des DAP-R Phänotyps in *S. aureus* spielen und inwieweit sie Synergien mit Mutationen in anderen Loci ausbilden, die ggf. zu erhöhten DAP-MHK-Werten führen (im Speziellen mit Mutationen in *mprF*), muss in nachfolgenden Klonierungsarbeiten experimentell validiert werden. Um in zukünftigen Assoziationsstudien die Detektion von *low-frequency* Varianten zu ermöglichen und die statistische Power von GWAS zu steigern, müssen die entsprechenden Stammkollektive um eine Vielzahl relevanter Studienisolate erweitert werden. Dabei muss jedoch stets bedacht werden, dass die Ergebnisse in Abhängigkeit der Zusammensetzung des Stammkollektivs variieren können (spezifische STs bzw. CCs) und eine statistisch signifikante Assoziation noch nichts über eine mögliche Kausalität aussagt.

Im Laufe unserer Untersuchungen zur Identifikation DAP-R assoziierter Mutationen wurde deutlich, dass wir sowohl in MRSA als auch MSSA Isolaten die Ausbildung identischer *mprF* Mutationen detektierten (vergl. Abbildung 23 und Abbildung 24). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu unseren Vermutungen, dass bei MRSA und MSSA unterschiedliche DAP-Resistenzmechanismen greifen, da MSSA Isolate wahrscheinlich keinem Therapie-assoziierten DAP-Selektionsdruck unterworfen waren (allerdings liegen uns auch hier keine Behandlungsinformationen vor). Eine mögliche Erklärung könnte in der *in vivo* Exposition von *S. aureus* gegenüber kationischen Wirtspeptiden gesucht werden, die möglicherweise die Ausbildung von DAP-R assoziierten Mutationen triggern [122]. Mishra *et al.* gehen davon aus, dass *S. aureus* im Laufe einer Infektion spezifischen CAMPs ausgesetzt ist, die zur Selektion von kreuzresistenten DAP-R *S. aureus* Isolaten führen und/oder die ersten Schritte der Adaptionen von überlebenden Organismen an DAP einleiten [245]. Im Gegensatz zu MRSA-bedingten Infektionen stehen Ärzten im Falle MSSA-bedingter Infektion jedoch umfangreiche Therapieoptionen zur Verfügung

(z.B. β -Laktamase-feste Penicilline, Cephalosporine und Nafciliin), wodurch die Prognose für den Krankheitsverlauf in der Regel positiv ausfällt [246].

Obwohl GWAS einen Hinweis darauf geben können, ob eine genetische Variante mit einem Phänotyp von Interesse assoziiert ist, muss die Kausalität der detektierten Variante in laborexperimentellen Untersuchungen nachgewiesen werden. Tatsächlich hat die Erfahrung mit menschlichen GWAS gezeigt, dass potentiell mit einem Phänotyp von Interesse assoziierte Loci unter Umständen nur eine geringe oder gar keine funktionelle Bedeutung bei der Etablierung einer beobachteten Merkmalsausprägung haben können [247]. Im Laufe unserer Analysen detektierten wir (*low-frequency*) *mprF* Mutationen, die in der Literatur noch nicht beschrieben worden sind und potentiell mit dem DAP-R Phänotyp in *S. aureus* korrelieren (vergl. 3.2.4). Um den funktionellen Einfluss der genetischen Varianten auf die Ausbildung des Phänotyps zu überprüfen, generierten wir nach der in 2.2.3.4 beschriebenen Vorgehensweise *S. aureus* Substitutionsmutanten. Die Überprüfung der DAP-MHK offenbarte, dass alle generierten Mutanten eine Überempfindlichkeit gegenüber DAP aufweisen, welche im gleichen Maße bei der *S. aureus* Deletionsmutante beobachtet werden kann (vergl. Abbildung 28). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu vorhergehenden Untersuchungen, die gezeigt haben, dass die entsprechenden Mutationen mit erhöhten DAP-MHKs korrelieren (vergl. Abbildung 5). Interessanterweise konnten Cameron *et al.* schon im Jahr 2015 zeigen, dass eine Deletion von *mprF* mit einer Überempfindlichkeit von *S. aureus* Isolaten gegenüber DAP einhergeht [248]. Die Überprüfung der *S. aureus* Transformanten bestätigte jedoch sowohl die Anwesenheit des Plasmids, als auch die Korrektheit der *mprF*-Gensequenz. Aus diesem Grund vermuten wir, dass die stark reduzierte DAP-MHK in diesem Fall auf eine fehlende Expression des Proteins zurückzuführen ist. Da die Komplementierung der *S. aureus* Deletionsmutante (SA113 Δ *mprF*) mit dem WT Plasmid (pRB474-*mprF*) den SA113 WT Phänotyp wiederherstellen konnte, kann die Plasmid-vermittelte Expression des nicht mutierten Proteins vorausgesetzt werden (vergl. Abbildung 28). Aus diesem Grund sequenzierten wir zwei genetisch modifizierte pRB474-*mprF* Plasmide mittels der Illumina-Technologie, um ggf. potentielle Frameshift-Mutationen oder weitere genetische Veränderungen zu detektieren, die möglicherweise im Laufe der *Site-directed mutagenesis* (SDM) entstanden. Hierbei zeigte sich, dass im Laufe der SDM ein MGE in die *mprF* Sequenz des Plasmids integriert wurde, wodurch die Expression des Proteins letztlich verhindert wurde (vergl. 3.3). Aufgrund von stark eingeschränkten zeitlichen Ressourcen konnten die Versuche zwar im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden, sollen jedoch im Rahmen zukünftiger Forschungsprojekte zu einem erfolgreichen Abschluss gebracht werden.

4.2.2 Detektion potentiell CPT-R assoziierter Mutationen

Analog zu dem Vorgehen der DAP GWAS, etablierten wir eine Stammsammlung von klinischen *S. aureus* Isolaten zur Detektion CPT-R assoziierter Mutationen (vergl. 4.2.1). Im Gegensatz zu der DAP-Studie ist jedoch bekannt, dass einige klonale Linien von *S. aureus* eine ausgeprägte Resistenz gegenüber CPT entwickelt haben. Diese Linien können in der Regel nur bedingt mit sensiblen Isolaten ergänzt werden, da keine entsprechenden Kontrollisolate zur Verfügung stehen. Dies gilt speziell für *S. aureus* Isolate mit dem ST 228 und ST 111, welche dem CC 5 angehören und bereits in vorhergehenden Studien mit erhöhten CPT-MHKs assoziiert wurden [31, 102]. Da uns jedoch nur eingeschränkte Informationen zu den STs der *S. aureus* Isolate vorlagen, wählten wir die Isolate in der Regel entsprechend ihrer CC-Zugehörigkeit aus. Auf dieser Grundlage beobachteten wir eine weitestgehend homogene Verteilung der Resistenz-Phänotypen (vergl. Abbildung 11). Wie erwartet wurde mit der Rekonstruktion der Verwandtschaftsverhältnisse auf genomweiter Ebene und der Bestimmung der STs eine Akkumulation von CPT-R *S. aureus* Isolate mit distinkten STs deutlich (primär ST 228 und ST 111; vergl. Abbildung 11 und Abbildung 18). Obwohl sich eine solche Clusterung im Prozess der Etablierung großer Stammsammlungen nicht immer umgehen lässt, empfehlen wir Stammkollektive auf der Basis von STs zu generieren (z.B. durch Ableitung aus dem *spa*-Typ), da diese eine höhere Auflösung der Verwandtschaftsverhältnisse gewährleisten (im Gegensatz zu CCs). Folglich können Anhäufungen von Isolaten eines STs mit ausschließlich resistenten Isolaten (bzw. Isolaten mit dem Phänotyp von Interesse) frühzeitig erkannt und entsprechende Cluster ggf. um weitere Kontrollisolate ergänzt werden. Auf diese Weise wird eine homogene Verteilung der Phänotypen gefördert und die Wahrscheinlichkeit verringert, falsch-positive Assoziationen zu detektieren.

In der PLINK GWAS nutzten wir 5 *hierBAPS* Subcluster, um die Populationsstruktur unseres Stammkollektivs in der Assoziationstestung zu berücksichtigen (vergl. Anhang 8). Trotz dieses Vorgehens deutete der konstruierte Q-Q Plot auf eine systematische Verzerrung der Ergebnisse hin (vergl. Abbildung 19C) [249]. Ein Ausschluss von Clustern mit ausschließlich resistenten Isolaten war in diesem Fall jedoch nicht umsetzbar, da die Größe der Stammsammlung folglich nicht mehr genügen würde, um eine statistische Testung der Varianten auf eine Assoziation zur beobachteten Merkmalsausprägung zu erlauben. Aus diesem Grund nutzten wir zusätzlich das Genomic Control Verfahren, welches zu einer einheitlichen Anpassung der p -Werte auf der Grundlage des Inflationsfaktors λ_{GC} führt [221, 249]. Durch die angewandte Korrektur kam es zu einer Annäherung der $-\log_{10} p$ -Werte an die $X=Y$ Referenzlinie des Q-Q Plots, wodurch die Wahrscheinlichkeit reduziert wurde, falsch-positive Assoziationen zu detektieren (vergl. Abbildung 19D). Im Gegensatz zu PLINK nutzt SEER Distanzmatrizen und das Prinzip der MDS, um Populationsstrukturen in der Assoziationstestung zu berücksichtigen [176]. Zusätzlich generiert das Tool korrigierte p -Werte, die anhand des LRT oder Wald-Tests ermittelt werden.

Obwohl der LRT in den meisten Situationen als leistungsfähigere Alternative gilt, scheint der Wald-Test vor allem in den Situationen überlegen zu sein, wo Populationsstrukturen einen starken Einfluss auf die Studien ausüben (leesjohn.wordpress.com, Eintrag vom 27.10.2016). So konnten wir zeigen, dass die Wald-Adjustierung zwar sehr stringent ist, jedoch zu einer Anpassung der $-\log_{10} p$ -Werte an die X=Y Referenzlinie des generierten Q-Q Plots führt (vergl. Abbildung 20 D). Ein Ansatz, um den ausgeprägten Populationsstrukturen von Bakterien in zukünftigen GWAS besser entgegenwirken zu können, könnte in der Untersuchung einzelner klonaler Linien liegen. Allerdings ist die Anzahl von vollständig sequenzierten bakteriellen Isolaten noch häufig limitiert, wodurch eine Fokussierung auf einzelne STs bzw. CCs in der Regel nur schwer realisierbar ist. Des Weiteren ist bekannt, dass kausale Mutationen in Abhängigkeit der betrachteten klonalen Linie variieren können. So konnte in einer vorhergehenden Studie gezeigt werden, dass Mutationen, die mit dem VISA Phänotyp korrelieren, zum Teil mit spezifischen Linien von *S. aureus* assoziiert sind. Auch wir konnten zeigen, dass potentiell DAP-R assoziierte Mutationen in *mprF* eine leichte Tendenz aufweisen, mit distinkten CCs bzw. STs verknüpft zu sein (vergl. Abbildung 23 und Abbildung 24 [250]). Aus diesem Grund sollte bei einer Fokussierung auf einzelne klonale Linien bedacht werden, dass signifikant assoziierte Mutationen zwar potentiell den Phänotyp von Interesse in der untersuchten Population erklären, die Ergebnisse jedoch nicht ohne Weiteres auf die gesamte Population übertragen werden können.

Obwohl wir mittels der PLINK GWAS keine Mutationen identifizieren konnten, die auf genomweitem Level signifikant mit dem CPT-R Phänotyp in *S. aureus* korrelieren, detektierten wir nahe der suggestiven Assoziationsgrenze des Manhattan Plots die ASS *gria* S80F und *gyrA* S84L (vergl. Abbildung 25). Interessanterweise wurden selbige ASS in bereits veröffentlichten Studien mit erhöhten Ciprofloxacin (CIP) MHKs in Verbindung gebracht [251, 252]. Daten des NRZ für Staphylokokken und Enterokokken und Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Knight *et al.* zeigen, dass dominante HA-MRSA Klone nahezu universell gegen CIP resistent sind und dieser Resistenzphänotyp zur Selektion und zum Überleben der Erreger beiträgt [253, 254]. In der Tat stellte sich auch in der vorliegenden Untersuchung heraus, dass 95 % und 42 % der klinischen CPT-R bzw. CPT-S *S. aureus* Isolate eine Unempfindlichkeit gegenüber CIP aufweisen und die entsprechenden Mutationen in *gria* und *gyrA* tragen (vergl. Anhang 3). Eine Detektion solcher „Kreuzmutationen“ ist in GWAS vermutlich nicht immer vermeidbar, da nosokomiale Infektionserreger (im Speziellen HA-MRSA) häufig Resistenzen gegenüber multiplen Antibiotika etabliert haben. Dieser Umstand verdeutlicht wiederholt, dass eine laborexperimentelle Validierung der Ergebnisse einer GWAS von grundlegender Bedeutung ist, um die Detektion falsch-positiver Assoziationen zu vermeiden.

Obwohl bereits in vorhergehenden Studien ASS in PBP2a beschrieben wurden, die mit erhöhten CPT-MHKs in *S. aureus* korrelieren und SEER dazu in der Lage ist, Unterschiede im Gengehalt zu detektieren, konnten wir im Laufe der SEER Assoziationsstudie keine Mutationen in *mecA* detektieren. In

der anschließenden manuellen Untersuchung der SCCmec Elemente (vergl. 2.2.4.5) beobachteten wir jedoch diverse ASS in *mecA* von CPT-R *S. aureus* Isolaten und zeigten, dass diese weitestgehend mit distinkten CCs bzw. STs assoziiert sind (vergl. Abbildung 26 und Abbildung 27). Bei der Betrachtung der Diversität *mecA* assoziierter Mutationen wird deutlich, weshalb SEER in der Detektion entsprechender Mutationen limitiert war bzw. weshalb distinkte K-mere die genomweite Assoziationsgrenze nicht überschritten. In diesem Fall wurden K-mere in Sequenzeinheiten mit geringerer Frequenz gesplittet, wodurch das Signifikanzniveau drastisch reduziert und eine Detektion der entsprechenden Mutationen verhindert wurde (vergl. 4.1) [184]. Folglich wird auch hier deutlich, dass die Anzahl von Stämmen in zukünftigen bakteriellen GWAS signifikant erhöht werden muss, um eine Detektion kausaler Mutationen auf genomweisem Level zu ermöglichen, die möglicherweise mit einer niedrigen Frequenz auftreten oder mit einer klonalen Linie assoziiert sind. Zu den *mecA* Varianten, die wir am häufigsten detektierten, gehören die ASS N146K, N204K und G246E (vergl. Abbildung 26, Abbildung 27). In dem Jahr 2015 untersuchten Lahiri *et al.* anhand einer diversen Stammsammlung von 184 MRSA Isolaten den Einfluss von *mecA*-Varianten auf die Ausbildung einer CPT-Resistenz [104]. Im Laufe dieser Studie stellte sich heraus, dass die Mehrheit der ASS der nPBD von PBP2a (darunter N146K, E150K und E239K) in einer Furche lokalisiert vorliegen und in räumlicher Nähe zueinander angeordnet sind [104]. Ein Großteil der verbleibenden PBP2a-Varianten, die mit einer geringeren Frequenz beobachtet wurden (z.B. D139N, N204K und T235I), befinden sich ebenfalls an exponierten Regionen dieser Vertiefung [104]. Durch Untersuchungen von Otero *et al.* weiß man, dass diese Domäne für die allosterische Konformationsänderung des Proteins verantwortlich ist [105]. Die Autoren vermuteten, dass die Mutationen sowohl das elektrostatische Potential der gesamten Domäne beeinflussen, als auch zu Veränderungen des Salzbrücken-Netzwerkes führen, das für die allosterische Reaktion verantwortlich ist [105]. Darauf aufbauend wurde spekuliert, dass Modifikationen in der nPBD von PBP2a zu einer Beeinträchtigung der Bindungseffizienz des CPT führen und eine Unterbrechung der allosterischen Reaktion bedingen, wodurch verhindert wird, dass ein zweites Molekül von CPT das aktive Serin der PBD blockiert [105]. Des Weiteren postulierten Alm *et al.* in dem Jahr 2014, dass Mutationen in der nPBD möglicherweise zu einer Destabilisierung der PBP2a-PBP2 Wechselwirkung führen und unter Umständen eine Interaktion zwischen PBP2a und PBP4 fördern, welches eine geringe Affinität gegenüber CPT aufweist [94]. Im Gegensatz zu den meisten der in unserer Studie beobachteten *mecA* ASS konnten wir die ASS G246E nicht nur in CPT-R, sondern auch in mehreren CPT-S Isolaten detektieren (vergl. Abbildung 26 und Abbildung 27). Da diese ASS in bereits publizierten Studien mit CPT-MHKs von ≤ 1 mg/L assoziiert wurde, halten wir eine Beteiligung der ASS an der Ausbildung einer CPT-Resistenz für unwahrscheinlich [94, 103, 104]. Zusätzlich konnten wir den CPT-R Phänotyp in insgesamt 12 weiteren *S. aureus* Isolaten nicht anhand von *mecA* Mutationen erklären (vergl. Abbildung 26 und Abbildung 27). Dies betrifft vor allem Isolate mit dem ST 225 (vergl. Abbildung 27). Diese Beobachtungen bestätigen die Annahme, dass weitere,

mecA-unabhängige Mechanismen zur Etablierung einer CPT-Resistenz in *S. aureus* beitragen [94, 104, 255, 256]. Tatsächlich detektierten vorhergehende *in vitro* Studien *mecA*-unabhängige Mutationen, die mit erhöhten CPT-MHKs korrelierten [257, 258]. Hierzu gehören sowohl Mutationen in Genen, die eine Rolle bei der Entwicklung einer β -Laktam Resistenz spielen (*acrB*, *pp2C*, *clpX*, *rho*, *gdpP*), als auch in Genen, die für die PBPs 1–4 kodieren. Im Rahmen unserer Untersuchungen detektierten wir jedoch ausschließlich in einem der 12 CPT-R *S. aureus* Isolate ASS in PBP1 und PBP2 (Daten nicht gezeigt). Folglich scheinen weitere und noch unbekannte genetische Elemente eine Rolle bei der Entwicklung einer CPT-Resistenz in *S. aureus* zu spielen, deren Identitäten möglicherweise durch Assoziationsstudien mit deutlich größeren Stichprobenzahlen aufgedeckt werden können. Besonders interessant ist die Tatsache, dass wir in unserer Stammsammlung 14 CPT-R *S. aureus* Isolate detektierten, deren Isolation vor Markteinführung von CPT erfolgte (vor 2012) (vergl. Abbildung 26 und Abbildung 27). Auch Kelly *et al.* konnten zeigen, dass einige klonale Linien von *S. aureus* (insbesondere ST 228) bereits um 1998 eine Resistenz gegenüber CPT selektierten [255]. Die Autoren beschrieben verschiedene *mecA* Varianten in mehreren MLST-Linien, die auf unabhängige Mutationsereignisse und noch unbekannte Selektionsfaktoren hindeuten [255]. Da zudem gezeigt wurde, dass das Potential von CPT gering ist, die Entwicklung Resistenz-assoziiierter Mutationen zu triggern, ist es wahrscheinlich, dass weitere therapeutische Wirkstoffe, wie z.B. andere β -Laktame, zur Selektion von (*mecA*) Mutationen beitragen, die eine Resistenzentwicklung von *S. aureus* gegenüber CPT begünstigen [255, 259]. Diese Annahme wird durch unsere Ergebnisse unterstützt, da wir einen Zusammenhang zwischen der Höhe der CPT- und OXA-MHK beobachten konnten (vergl. Abbildung 26 und Abbildung 27). Folglich könnte eine routinemäßige und erweiterte Überprüfung der OXA-MHK bereits einen Hinweis darauf geben, ob eine Resistenz von *S. aureus* gegenüber CPT erwartet werden kann.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Prävalenzen invasiver MRSA Isolate in der EU und den Ländern des europäischen Wirtschaftsraumes in 2016.	14
Abbildung 2 Häufigkeit invasiver <i>S. aureus</i> Isolate mit einer Resistenz gegenüber Methicillin in Deutschland von 2010 bis 2016.	14
Abbildung 3 Beispielhafte Darstellung antimikrobieller Zielstrukturen, des Erwerbs von Resistenzen und der involvierten Resistenzmechanismen.	19
Abbildung 4 Schematische Darstellung von PBP2a mit potentiell CPT-R assoziierten Mutationen.	23
Abbildung 5 Schematische Darstellung von MprF mit potentiell DAP-R assoziierten Mutationen.	25
Abbildung 6 Entwicklung der Kosten für sequenzierte DNA von 2001 – 2017.	28
Abbildung 7 Anstieg der kumulativen Anzahl von sequenzierten Genomen über einen Zeitraum von 10 Jahren (2010 – 2017).	30
Abbildung 8 Linkage Disequilibrium (LD).	32
Abbildung 9 Schematische Darstellung der <i>population stratification</i> in GWAS.	33
Abbildung 10 Schematische Abbildung der Plasmidkarten von pRB474- <i>mprF</i> (A) und pRB474 (B).	43
Abbildung 11 Verteilung der Antibiotika-resistenten und -empfindlichen Stämme innerhalb der STs bzw. CCs der (A) DAP- und (B) CPT-Stammsammlung.	49
Abbildung 12 Schematische Darstellung der Mutagenese von <i>S. aureus</i>	57
Abbildung 13 Fließschema einer PLINK GWAS.	64
Abbildung 14 Fließschema einer SEER GWAS.	65
Abbildung 15 Einsendungen von <i>S. aureus</i> Isolaten an das RKI von 2008 bis 2017.	67
Abbildung 16 Darstellung der Konkordanz bei der Bestimmung der DAP-MHK zwischen der MBV Referenzmethode und kommerziell erhältlichen Testsystemen.	69
Abbildung 17 Neighbor-Joining Baum von 99 <i>S. aureus</i> Isolaten zur Identifizierung DAP-R assoziierter Mutationen.	71
Abbildung 18 Neighbor-Joining Baum von 88 <i>S. aureus</i> Isolaten zur Identifizierung CPT-R assoziierter Mutationen.	72
Abbildung 19 Darstellung des Ausmaßes der <i>population stratification</i> in den durchgeführten PLINK Assoziationsstudien.	73
Abbildung 20 Darstellung des Ausmaßes <i>population stratification</i> in den durchgeführten SEER Assoziationsstudien.	75
Abbildung 21 Darstellung der Ergebnisse der DAP PLINK GWAS anhand eines Manhattan Plots.	76
Abbildung 22 Darstellung der Ergebnisse der DAP SEER GWAS.	76
Abbildung 23 Heatmap von potentiell DAP-R assoziierten SNPs (Part 1).	78

Abbildung 24 Heatmap von potentiell DAP-R assoziierten SNPs (Part 2).	79
Abbildung 25 Darstellung der Ergebnisse der CPT PLINK GWAS anhand eines Manhattan Plots.....	80
Abbildung 26 Heatmap von potentiell CPT-R assoziierten Mutationen in den SCCmec Kernelementen (Part 1).....	82
Abbildung 27 Heatmap von potentiell CPT-R assoziierten Mutationen in den SCCmec Kernelementen (Part 2).....	83
Abbildung 28 Darstellung der DAP-MHK von <i>S. aureus</i> Substitutionsmutanten und Kontrollen.	84
Abbildung 29 Darstellung der IS4-ähnlichen Transposase aus pRB474- <i>mprF</i> P314L/A315T.	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Geräte.....	37
Tabelle 2 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	38
Tabelle 3 Eingesetzte Chemikalien	39
Tabelle 4 Verwendete Antibiotika	39
Tabelle 5 Verwendete MHK-Teststreifen	40
Tabelle 6 Eingesetzte Medien.....	40
Tabelle 7 Verwendete gebrauchsfertige Lösungen.....	41
Tabelle 8 Verwendete Pufferlösungen (Eigenherstellung).....	41
Tabelle 9 Verwendete Enzyme	42
Tabelle 10 Verwendete Plasmidvektoren.....	42
Tabelle 11 Verwendete Primer	44
Tabelle 12 Verwendete Software und Tools	46
Tabelle 13 Verwendete <i>in house</i> Software Pipelines	47
Tabelle 14 Verwendete bakterielle Isolate.....	50
Tabelle 15 Verwendete Plasmide, Restriktionsenzyme und Puffer	61
Tabelle 16 Konkordanz zwischen DAP-MHKs verschiedener Testsysteme im Vergleich zu der MBV Referenzmethode.....	68
Tabelle 17 Auflistung der in dieser Arbeit etablierten <i>mprF S. aureus</i> Substitutionsmutanten.	84

Literaturverzeichnis

1. Williams, R.E., *Healthy carriage of Staphylococcus aureus: its prevalence and importance*. Bacteriol Rev, 1963. **27**: p. 56-71.
2. Lowy, F.D., *Staphylococcus aureus infections*. N Engl J Med, 1998. **339**(8): p. 520-32.
3. Lee, A.S., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Nat Rev Dis Primers, 2018. **4**: p. 18033.
4. Kluytmans, J., A. van Belkum, and H. Verbrugh, *Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(3): p. 505-20.
5. Kropec, A., et al., *Exogenous or endogenous reservoirs of nosocomial Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus infections in a surgical intensive care unit*. Intensive Care Med, 1993. **19**(3): p. 161-5.
6. Gordon, R.J. and F.D. Lowy, *Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection*. Clin Infect Dis, 2008. **46** Suppl 5: p. S350-9.
7. Kobayashi, S.D. and F.R. DeLeo, *Staphylococcus aureus protein A promotes immune suppression*. MBio, 2013. **4**(5): p. e00764-13.
8. McCormick, J.K., J.M. Yarwood, and P.M. Schlievert, *Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update*. Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 77-104.
9. Katayama, Y., T. Ito, and K. Hiramatsu, *A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(6): p. 1549-55.
10. Hiramatsu, K., et al., *The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol, 2001. **9**(10): p. 486-93.
11. Boswihi, S. and E. Udo, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: An update on the epidemiology, treatment options and infection control*. Current Medicine Research and Practice, 2018. **8**(1): p. 18-24.
12. Chavez, T.T. and C.F. Decker, *Health care-associated MRSA versus community-associated MRSA*. Dis Mon, 2008. **54**(12): p. 763-8.
13. Graffunder, E.M. and R.A. Venezia, *Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection including previous use of antimicrobials*. J Antimicrob Chemother, 2002. **49**(6): p. 999-1005.
14. Coello, R., et al., *Risk factors for developing clinical infection with methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) amongst hospital patients initially only colonized with MRSA*. J Hosp Infect, 1997. **37**(1): p. 39-46.
15. Asensio, A., et al., *Colonization and infection with methicillin-resistant Staphylococcus aureus: associated factors and eradication*. Infect Control Hosp Epidemiol, 1996. **17**(1): p. 20-8.
16. Safdar, N. and D.G. Maki, *The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant Staphylococcus aureus, enterococcus, gram-negative bacilli, Clostridium difficile, and Candida*. Ann Intern Med, 2002. **136**(11): p. 834-44.
17. White, A., *Increased Infection Rates in Heavy Nasal Carriers of Coagulase-Positive Staphylococci*. Antimicrob Agents Chemother (Bethesda), 1963. **161**: p. 667-70.
18. Wertheim, H.F., et al., *Risk and outcome of nosocomial Staphylococcus aureus bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers*. Lancet, 2004. **364**(9435): p. 703-5.
19. Muto, C.A., et al., *SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of Staphylococcus aureus and enterococcus*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2003. **24**(5): p. 362-86.
20. Shiomori, T., H. Miyamoto, and K. Makishima, *Significance of airborne transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in an otolaryngology-head and neck surgery unit*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2001. **127**(6): p. 644-8.
21. Eriksen, K.R., [*"Celbenin"-resistant staphylococci*]. Ugeskr Laeger, 1961. **123**: p. 384-6.

22. Panlilio, A.L., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in U.S. hospitals, 1975-1991*. Infect Control Hosp Epidemiol, 1992. **13**(10): p. 582-6.
23. Couto, I., et al., *Unusually large number of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in a Portuguese hospital*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(8): p. 2032-5.
24. Chambers, H.F. and F.R. Deleo, *Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(9): p. 629-41.
25. Oliveira, D.C., A. Tomasz, and H. de Lencastre, *Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Lancet Infect Dis, 2002. **2**(3): p. 180-9.
26. Vivoni, A.M. and B.M. Moreira, *Application of molecular techniques in the study of Staphylococcus aureus clonal evolution--a review*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005. **100**(7): p. 693-8.
27. Stefani, S., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods*. Int J Antimicrob Agents, 2012. **39**(4): p. 273-82.
28. Moellering, R.C., Jr., *MRSA: the first half century*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(1): p. 4-11.
29. Lenz, W., E. Eilers, and U. Lehmacher, *[Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from 1974 to 1983 in West Germany with respect to the results of lysotyping]*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A, 1988. **268**(2): p. 277-93.
30. Witte, W., D. Nguyen Van, and K. Dunnhaupt, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in the German Democratic Republic. Incidence and strain-characteristics*. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol, 1986. **30**(2): p. 185-93.
31. Strommenger, B., et al., *Pre-Use Susceptibility to Ceftaroline in Clinical Staphylococcus aureus Isolates from Germany: Is There a Non-Susceptible Pool to be Selected?* PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0125864.
32. Schaumburg, F., et al., *Population dynamics among methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates in Germany during a 6-year period*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(10): p. 3186-92.
33. David, M.Z. and R.S. Daum, *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic*. Clin Microbiol Rev, 2010. **23**(3): p. 616-87.
34. Gottlieb, R.D., et al., *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in otolaryngology*. Otolaryngol Head Neck Surg, 1992. **107**(3): p. 434-7.
35. Rathore, M.H. and M.W. Kline, *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in children*. Pediatr Infect Dis J, 1989. **8**(9): p. 645-7.
36. Berman, D.S., W. Eisner, and B. Kreiswirth, *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection*. N Engl J Med, 1993. **329**(25): p. 1896.
37. Naimi, T.S., et al., *Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection*. JAMA, 2003. **290**(22): p. 2976-84.
38. Thurlow, L.R., G.S. Joshi, and A.R. Richardson, *Virulence strategies of the dominant USA300 lineage of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA)*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012. **65**(1): p. 5-22.
39. Buckingham, S.C., et al., *Emergence of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus at a Memphis, Tennessee Children's Hospital*. Pediatr Infect Dis J, 2004. **23**(7): p. 619-24.
40. Henderson, A. and G.R. Nimmo, *Control of healthcare- and community-associated MRSA: recent progress and persisting challenges*. Br Med Bull, 2018. **125**(1): p. 25-41.
41. Rossi, F., et al., *Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage*. N Engl J Med, 2014. **370**(16): p. 1524-31.
42. Boyle-Vavra, S. and R.S. Daum, *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the role of Panton-Valentine leukocidin*. Lab Invest, 2007. **87**(1): p. 3-9.
43. Diep, B.A., et al., *Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains harboring the genes for Panton-Valentine leukocidin*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(5): p. 2080-4.
44. Rossney, A.S., et al., *The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (pvl) reveal that*

- pvl* is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland. J Clin Microbiol, 2007. **45**(8): p. 2554-63.
45. Otter, J.A., et al., *Identification and control of an outbreak of ciprofloxacin-susceptible EMRSA-15 on a neonatal unit*. J Hosp Infect, 2007. **67**(3): p. 232-9.
 46. David, M.Z., et al., *What is community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus?* J Infect Dis, 2008. **197**(9): p. 1235-43.
 47. Otter, J.A. and G.L. French, *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains as a cause of healthcare-associated infection*. J Hosp Infect, 2011. **79**(3): p. 189-93.
 48. Maree, C.L., et al., *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates causing healthcare-associated infections*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(2): p. 236-42.
 49. Klevens, R.M., et al., *Changes in the epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in intensive care units in US hospitals, 1992-2003*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(3): p. 389-91.
 50. Otter, J.A. and G.L. French, *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the case for a genotypic definition*. J Hosp Infect, 2012. **81**(3): p. 143-8.
 51. Mohammed S. and N. S., *Review on Livestock Associated Methicillin Resistant Staphylococcus aureus and its Zoonotic Importance*. Internation Journal of Microbiological Research, 2015. **6**(3): p. 164-174.
 52. Cuny, C., et al., *Nasal colonization of humans with methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6800.
 53. Graveland, H., et al., *Persistence of livestock associated MRSA CC398 in humans is dependent on intensity of animal contact*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e16830.
 54. Cuny, C., L.H. Wieler, and W. Witte, *Livestock-Associated MRSA: The Impact on Humans*. Antibiotics (Basel), 2015. **4**(4): p. 521-43.
 55. Pantosti, A., *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Associated with Animals and Its Relevance to Human Health*. Front Microbiol, 2012. **3**: p. 127.
 56. Butaye, P., M.A. Argudin, and T.C. Smit, *Livestock-Associated MRSA and Its Current Evolution*. Current Clinical Microbiology Reports, 2016. **3**(1): p. 19-31.
 57. van Cleef, B.A., et al., *Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in humans, Europe*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(3): p. 502-5.
 58. Layer, F., et al., *Aktuelle Daten und Trends zu Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus (MRSA)*. Bundesgesundheitsblatt, 2012. **55**: p. 1377-1386.
 59. Palavecino, E.L., *Rapid methods for detection of MRSA in clinical specimens*. Methods Mol Biol, 2014. **1085**: p. 71-83.
 60. RKI, *Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health*. Epidemiologisches Bulletin, 2005. **42**.
 61. Huletsky, A., et al., *New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus directly from specimens containing a mixture of staphylococci*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(5): p. 1875-84.
 62. Kim, J.U., et al., *Multiplex real-time PCR assay for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains suitable in regions of high MRSA endemicity*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(3): p. 1008-13.
 63. Ligozzi, M., et al., *Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(5): p. 1681-6.
 64. Demain, A.L., *Antibiotics: natural products essential to human health*. Med Res Rev, 2009. **29**(6): p. 821-42.
 65. Kohanski, M.A., D.J. Dwyer, and J.J. Collins, *How antibiotics kill bacteria: from targets to networks*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(6): p. 423-35.
 66. Bbosa, G.S., et al., *Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance*. Scientific Research Publishing 2014. **6** (5): p. 410-425.

67. Chellat, M.F., L. Gaguz, and R. Riedl, *Antibiotikaresistenzen gezielt überwinden*. Angewandte Chemie, 2016. **128**(23): p. 6710-6734.
68. Levy, S.B. and B. Marshall, *Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses*. Nat Med, 2004. **10**(12 Suppl): p. S122-9.
69. Levy, D.T., et al., *Successful treatment of a left ventricular assist device infection with daptomycin non-susceptible methicillin-resistant Staphylococcus aureus: case report and review of the literature*. Transpl Infect Dis, 2012. **14**(5): p. E89-96.
70. Walsh, C., *Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 775-81.
71. Foster, T.J., *Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Current status and future prospects*. FEMS Microbiol Rev, 2017. **41**(3): p. 430-449.
72. Howden, B.P., et al., *Reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications*. Clin Microbiol Rev, 2010. **23**(1): p. 99-139.
73. Philippon, A., G. Arlet, and P. Lagrange, *[Extended spectrum beta-lactamases]*. Rev Prat, 1993. **43**(18): p. 2387-95.
74. Sauvage, E., et al., *The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(2): p. 234-58.
75. Tipper, D.J. and J.L. Strominger, *Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. **54**(4): p. 1133-41.
76. Blumberg, P.M. and J.L. Strominger, *Interaction of penicillin with the bacterial cell: penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes*. Bacteriol Rev, 1974. **38**(3): p. 291-335.
77. Bondi, A., Jr. and C.C. Dietz, *Penicillin resistant staphylococci*. Proc Soc Exp Biol Med, 1945. **60**: p. 55-8.
78. Lowy, F.D., *Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus*. J Clin Invest, 2003. **111**(9): p. 1265-73.
79. Chambers, H.F., *Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(4): p. 781-91.
80. Hiramatsu, K., *Molecular evolution of MRSA*. Microbiol Immunol, 1995. **39**(8): p. 531-43.
81. Hanssen, A.M. and J.U. Ericson Sollid, *SCCmec in staphylococci: genes on the move*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006. **46**(1): p. 8-20.
82. Tsubakishita, S., et al., *Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(10): p. 4352-9.
83. Rolo, J., et al., *Evolutionary Origin of the Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec)*. Antimicrob Agents Chemother, 2017. **61**(6).
84. Antignac, A. and A. Tomasz, *Reconstruction of the phenotypes of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by replacement of the staphylococcal cassette chromosome mec with a plasmid-borne copy of Staphylococcus sciuri pbpD gene*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(2): p. 435-41.
85. Baig, S., et al., *Novel SCCmec type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol, 2018. **61**: p. 74-76.
86. Lim, D. and N.C. Strynadka, *Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(11): p. 870-6.
87. Pinho, M.G., H. de Lencastre, and A. Tomasz, *An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10886-91.
88. Garcia-Alvarez, L., et al., *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study*. Lancet Infect Dis, 2011. **11**(8): p. 595-603.
89. Becker, K., et al., *Plasmid-Encoded Transferable mecB-Mediated Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis, 2018. **24**(2): p. 242-248.

90. Tsubakishita, S., et al., *Staphylococcal cassette chromosome mec-like element in *Micrococcus caseolyticus**. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(4): p. 1469-75.
91. Sievert, D.M., et al., *Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(5): p. 668-74.
92. Tsiodras, S., et al., *Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus**. Lancet, 2001. **358**(9277): p. 207-8.
93. Hayden, M.K., et al., *Development of Daptomycin resistance in vivo in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus**. J Clin Microbiol, 2005. **43**(10): p. 5285-7.
94. Alm, R.A., et al., *Analysis of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with reduced susceptibility to ceftaroline: an epidemiological and structural perspective*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(8): p. 2065-75.
95. Lim, L., E. Sutton, and J. Brown, *Ceftaroline: a new broad-spectrum cephalosporin*. Am J Health Syst Pharm, 2011. **68**(6): p. 491-8.
96. Jorgenson, M.R., D.D. DePestel, and P.L. Carver, *Ceftaroline fosamil: a novel broad-spectrum cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus**. Ann Pharmacother, 2011. **45**(11): p. 1384-98.
97. Yee, C., Biek, D., Krause, K., Williams, G. , *Ceftaroline: a Cephalosporin with Anti-MRSA Activity*. ScienceDirect, 2011. **33**(21): p. 161-169.
98. Kosowska-Shick, K., P.L. McGhee, and P.C. Appelbaum, *Affinity of ceftaroline and other beta-lactams for penicillin-binding proteins from *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae**. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(5): p. 1670-7.
99. Otero, L.H., et al., *How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(42): p. 16808-13.
100. Acebron, I., et al., *The Allosteric Site for the Nascent Cell Wall in Penicillin-Binding Protein 2a: An Achilles' Heel of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus**. Curr Med Chem, 2015. **22**(14): p. 1678-86.
101. Long, S.W., et al., *PBP2a mutations causing high-level Ceftaroline resistance in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(11): p. 6668-74.
102. Mendes, R.E., et al., *Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* displaying increased MICs of ceftaroline*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(6): p. 1321-4.
103. Schaumburg, F., et al., *Missense mutations of PBP2a are associated with reduced susceptibility to ceftaroline and ceftobiprole in African MRSA*. J Antimicrob Chemother, 2016. **71**(1): p. 41-4.
104. Lahiri, S.D., et al., *Molecular characterization of MRSA isolates bracketing the current EUCAST ceftaroline-susceptible breakpoint for *Staphylococcus aureus*: the role of PBP2a in the activity of ceftaroline*. J Antimicrob Chemother, 2015. **70**(9): p. 2488-98.
105. Fishovitz, J., et al., *Disruption of allosteric response as an unprecedented mechanism of resistance to antibiotics*. J Am Chem Soc, 2014. **136**(28): p. 9814-7.
106. Lee, H., et al., *Ceftaroline resistance by clone-specific polymorphism in penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus**. Antimicrob Agents Chemother, 2018.
107. Argudin, M.A., et al., *In vitro activity of ceftaroline against clinical *Staphylococcus aureus* isolates collected during a national survey conducted in Belgian hospitals*. J Antimicrob Chemother, 2017. **72**(1): p. 56-59.
108. Chan, L.C., et al., *PBP 4 Mediates High-Level Resistance to New-Generation Cephalosporins in *Staphylococcus aureus**. Antimicrob Agents Chemother, 2016. **60**(7): p. 3934-41.
109. Gonzalez-Ruiz, A., et al., *Clinical experience with daptomycin in Europe: the first 2.5 years*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(4): p. 912-9.
110. Miller, W.R., A.S. Bayer, and C.A. Arias, *Mechanism of Action and Resistance to Daptomycin in *Staphylococcus aureus* and *Enterococci**. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(11).
111. Bals, R. and J.M. Wilson, *Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(4): p. 711-20.

112. Scott, W.R., et al., *NMR structural studies of the antibiotic lipopeptide daptomycin in DHPC micelles*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(12): p. 3116-26.
113. Bayer, A.S., T. Schneider, and H.G. Sahl, *Mechanisms of daptomycin resistance in Staphylococcus aureus: role of the cell membrane and cell wall*. Ann N Y Acad Sci, 2013. **1277**: p. 139-58.
114. Zhang, T., et al., *Daptomycin forms cation- and size-selective pores in model membranes*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1838**(10): p. 2425-30.
115. Silverman, J.A., N.G. Perlmutter, and H.M. Shapiro, *Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003. **47**(8): p. 2538-2544.
116. Sader, H.S., et al., *Daptomycin activity tested against 164457 bacterial isolates from hospitalised patients: summary of 8 years of a Worldwide Surveillance Programme (2005-2012)*. Int J Antimicrob Agents, 2014. **43**(5): p. 465-9.
117. Skiest, D.J., *Treatment failure resulting from resistance of Staphylococcus aureus to daptomycin*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(2): p. 655-6.
118. Mariani, P.G., H.S. Sader, and R.N. Jones, *Development of decreased susceptibility to daptomycin and vancomycin in a Staphylococcus aureus strain during prolonged therapy*. J Antimicrob Chemother, 2006. **58**(2): p. 481-3.
119. Julian, K., et al., *Characterization of a daptomycin-nonsusceptible vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus strain in a patient with endocarditis*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(9): p. 3445-8.
120. Sharma, M., et al., *High rate of decreasing daptomycin susceptibility during the treatment of persistent Staphylococcus aureus bacteremia*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008. **27**(6): p. 433-7.
121. Ernst, C.M., et al., *The bacterial defensin resistance protein MprF consists of separable domains for lipid lysinylation and antimicrobial peptide repulsion*. PLoS Pathog, 2009. **5**(11): p. e1000660.
122. Bayer, A.S., et al., *Frequency and Distribution of Single-Nucleotide Polymorphisms within mprF in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Clinical Isolates and Their Role in Cross-Resistance to Daptomycin and Host Defense Antimicrobial Peptides*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(8): p. 4930-7.
123. Staubitz, P., et al., *MprF-mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance*. FEMS Microbiol Lett, 2004. **231**(1): p. 67-71.
124. Peleg, A.Y., et al., *Whole genome characterization of the mechanisms of daptomycin resistance in clinical and laboratory derived isolates of Staphylococcus aureus*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e28316.
125. Mishra, N.N., et al., *In vitro cross-resistance to daptomycin and host defense cationic antimicrobial peptides in clinical methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(9): p. 4012-8.
126. Yang, S.J., et al., *Regulation of mprF in daptomycin-nonsusceptible Staphylococcus aureus strains*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(6): p. 2636-7.
127. Friedman, L., J.D. Alder, and J.A. Silverman, *Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(6): p. 2137-45.
128. Murthy, M.H., et al., *Daptomycin non-susceptible methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA 300 isolate*. J Med Microbiol, 2008. **57**(Pt 8): p. 1036-8.
129. Pillai, S.K., et al., *Daptomycin nonsusceptibility in Staphylococcus aureus with reduced vancomycin susceptibility is independent of alterations in MprF*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(6): p. 2223-5.
130. Boyle-Vavra, S., et al., *Comparative genome sequencing of an isogenic pair of USA800 clinical methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates obtained before and after daptomycin treatment failure*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(5): p. 2018-25.
131. Steed, M.E., et al., *Evaluation of Daptomycin Non-Susceptible Staphylococcus aureus for Stability, Population Profiles, mprF Mutations, and Daptomycin Activity*. Infect Dis Ther, 2013. **2**(2): p. 187-200.

132. Berti, A.D., et al., *Heterogeneity of genetic pathways toward daptomycin nonsusceptibility in Staphylococcus aureus determined by adjunctive antibiotics*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(5): p. 2799-806.
133. Humphries, R.M., S. Pollett, and G. Sakoulas, *A current perspective on daptomycin for the clinical microbiologist*. Clin Microbiol Rev, 2013. **26**(4): p. 759-80.
134. Yang, S.J., et al., *Causal role of single nucleotide polymorphisms within the mprF gene of Staphylococcus aureus in daptomycin resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(11): p. 5658-64.
135. Mehta, S., et al., *VraSR two-component regulatory system contributes to mprF-mediated decreased susceptibility to daptomycin in in vivo-selected clinical strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(1): p. 92-102.
136. Muraih, J.K., et al., *Characterization of daptomycin oligomerization with perylene excimer fluorescence: stoichiometric binding of phosphatidylglycerol triggers oligomer formation*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(3): p. 673-8.
137. Short, S.A. and D.C. White, *Biosynthesis of cardiolipin from phosphatidylglycerol in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 1972. **109**(2): p. 820-6.
138. Dubrac, S., et al., *A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalkR (YycGF) essential signal transduction pathway*. Mol Microbiol, 2008. **70**(6): p. 1307-22.
139. Fischer, A., et al., *Daptomycin resistance mechanisms in clinically derived Staphylococcus aureus strains assessed by a combined transcriptomics and proteomics approach*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(8): p. 1696-711.
140. Mishra, N.N., et al., *Carotenoid-related alteration of cell membrane fluidity impacts Staphylococcus aureus susceptibility to host defense peptides*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(2): p. 526-31.
141. Jones, T., et al., *Failures in clinical treatment of Staphylococcus aureus Infection with daptomycin are associated with alterations in surface charge, membrane phospholipid asymmetry, and drug binding*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(1): p. 269-78.
142. Cui, L., et al., *Correlation between Reduced Daptomycin Susceptibility and Vancomycin Resistance in Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(3): p. 1079-82.
143. Patel, J.B., et al., *An association between reduced susceptibility to daptomycin and reduced susceptibility to vancomycin in Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(11): p. 1652-3.
144. Weiss, A., et al., *The omega Subunit Governs RNA Polymerase Stability and Transcriptional Specificity in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2017. **199**(2).
145. Cui, L., et al., *An RpoB mutation confers dual heteroresistance to daptomycin and vancomycin in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(12): p. 5222-33.
146. Baek, K.T., et al., *Stepwise Decrease in Daptomycin Susceptibility in Clinical Staphylococcus aureus Isolates Associated with an Initial Mutation in rpoB and a Compensatory Inactivation of the clpX Gene*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015. **59**(11): p. 6983-6991.
147. Foxman, B., et al., *Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies*. Epidemiol Perspect Innov, 2005. **2**: p. 10.
148. Li, W., D. Raoult, and P.E. Fournier, *Bacterial strain typing in the genomic era*. FEMS Microbiol Rev, 2009. **33**(5): p. 892-916.
149. Quainoo, S., et al., *Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis*. Clin Microbiol Rev, 2017. **30**(4): p. 1015-1063.
150. Fleischmann, R.D., et al., *Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd*. Science, 1995. **269**(5223): p. 496-512.
151. Bertelli, C. and G. Greub, *Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology*. Clin Microbiol Infect, 2013. **19**(9): p. 803-13.
152. Koser, C.U., et al., *Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology*. PLoS Pathog, 2012. **8**(8): p. e1002824.

153. Lewis, T., et al., *High-throughput whole-genome sequencing to dissect the epidemiology of Acinetobacter baumannii isolates from a hospital outbreak*. J Hosp Infect, 2010. **75**(1): p. 37-41.
154. Snitkin, E.S., et al., *Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae with whole-genome sequencing*. Sci Transl Med, 2012. **4**(148): p. 148ra116.
155. Harris, S.R., et al., *Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread*. Science, 2010. **327**(5964): p. 469-74.
156. Besser, J., et al., *Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections*. Clin Microbiol Infect, 2018. **24**(4): p. 335-341.
157. Jackson, B.R., et al., *Implementation of Nationwide Real-time Whole-genome Sequencing to Enhance Listeriosis Outbreak Detection and Investigation*. Clin Infect Dis, 2016. **63**(3): p. 380-6.
158. Moura, A., et al., *Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of Listeria monocytogenes, France*. Emerg Infect Dis, 2017. **23**(9): p. 1462-1470.
159. Zankari, E., et al., *Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(4): p. 771-7.
160. Stoesser, N., et al., *Predicting antimicrobial susceptibilities for Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates using whole genomic sequence data*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(10): p. 2234-44.
161. Koser, C.U., et al., *Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak*. N Engl J Med, 2012. **366**(24): p. 2267-75.
162. Sabat, A.J., et al., *Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance*. Euro Surveill, 2013. **18**(4): p. 20380.
163. Power, R.A., J. Parkhill, and T. de Oliveira, *Microbial genome-wide association studies: lessons from human GWAS*. Nat Rev Genet, 2017. **18**(1): p. 41-50.
164. Read, T.D. and R.C. Massey, *Characterizing the genetic basis of bacterial phenotypes using genome-wide association studies: a new direction for bacteriology*. Genome Med, 2014. **6**(11): p. 109.
165. Sachidanandam, R., et al., *A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 928-33.
166. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
167. International HapMap, C., *A haplotype map of the human genome*. Nature, 2005. **437**(7063): p. 1299-320.
168. Klein, R.J., et al., *Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration*. Science, 2005. **308**(5720): p. 385-9.
169. Wellcome Trust Case Control, C., *Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls*. Nature, 2007. **447**(7145): p. 661-78.
170. de Lange, K.M., et al., *Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease*. Nat Genet, 2017. **49**(2): p. 256-261.
171. Tian, C., et al., *Genome-wide association and HLA region fine-mapping studies identify susceptibility loci for multiple common infections*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 599.
172. Falush, D. and R. Bowden, *Genome-wide association mapping in bacteria?* Trends Microbiol, 2006. **14**(8): p. 353-5.
173. Purcell, S., et al., *PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses*. Am J Hum Genet, 2007. **81**(3): p. 559-75.
174. Farhat, M.R., et al., *Genomic analysis identifies targets of convergent positive selection in drug-resistant Mycobacterium tuberculosis*. Nat Genet, 2013. **45**(10): p. 1183-9.
175. Thornton, T. and M.S. McPeck, *ROADTRIPS: case-control association testing with partially or completely unknown population and pedigree structure*. Am J Hum Genet, 2010. **86**(2): p. 172-84.
176. Lees, J.A., et al., *Sequence element enrichment analysis to determine the genetic basis of bacterial phenotypes*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12797.

177. Laabei, M., et al., *Predicting the virulence of MRSA from its genome sequence*. Genome Res, 2014. **24**(5): p. 839-49.
178. Coll, F., et al., *Genome-wide analysis of multi- and extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis*. Nat Genet, 2018. **50**(2): p. 307-316.
179. Chewapreecha, C., et al., *Comprehensive identification of single nucleotide polymorphisms associated with beta-lactam resistance within pneumococcal mosaic genes*. PLoS Genet, 2014. **10**(8): p. e1004547.
180. Volkman, S.K., et al., *Genome-Wide Association Studies of Drug-Resistance Determinants*. Trends Parasitol, 2017. **33**(3): p. 214-230.
181. Sheppard, S.K., et al., *Genome-wide association study identifies vitamin B5 biosynthesis as a host specificity factor in Campylobacter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(29): p. 11923-7.
182. Pearson, T.A. and T.A. Manolio, *How to interpret a genome-wide association study*. JAMA, 2008. **299**(11): p. 1335-44.
183. Chen, P.E. and B.J. Shapiro, *The advent of genome-wide association studies for bacteria*. Curr Opin Microbiol, 2015. **25**: p. 17-24.
184. Lees, J., *The background of bacterial GWAS*. 2017.
185. Falush, D., et al., *Recombination and mutation during long-term gastric colonization by Helicobacter pylori: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15056-61.
186. Suerbaum, S., et al., *Free recombination within Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12619-24.
187. Hirsh, A.E., et al., *Stable association between strains of Mycobacterium tuberculosis and their human host populations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(14): p. 4871-6.
188. Feil, E.J., et al., *How clonal is Staphylococcus aureus?* J Bacteriol, 2003. **185**(11): p. 3307-16.
189. Fitzgerald, J.R. and M.T. Holden, *Genomics of Natural Populations of Staphylococcus aureus*. Annu Rev Microbiol, 2016. **70**: p. 459-78.
190. Balding, D.J., *A tutorial on statistical methods for population association studies*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(10): p. 781-91.
191. Bruckner, R., *A series of shuttle vectors for Bacillus subtilis and Escherichia coli*. Gene, 1992. **122**(1): p. 187-92.
192. Coil, D., G. Jospin, and A.E. Darling, *A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data*. Bioinformatics, 2015. **31**(4): p. 587-9.
193. Li, H. and R. Durbin, *Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform*. Bioinformatics, 2010. **26**(5): p. 589-95.
194. Feil, E.J., et al., *eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data*. J Bacteriol, 2004. **186**(5): p. 1518-30.
195. Barrett, J.C., et al., *Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps*. Bioinformatics, 2005. **21**(2): p. 263-5.
196. Cheng, L., et al., *Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software*. Mol Biol Evol, 2013. **30**(5): p. 1224-8.
197. Kuraku, S., et al., *aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Web Server issue): p. W22-8.
198. Darling, A.C., et al., *Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements*. Genome Res, 2004. **14**(7): p. 1394-403.
199. Maddison, W.P. and D.R. Maddison, *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. 2018.
200. Hadfield, J., et al., *Phandango: an interactive viewer for bacterial population genomics*. Bioinformatics, 2017.
201. Chang, C.C., et al., *Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets*. Gigascience, 2015. **4**: p. 7.
202. Rozen, S. and H. Skaletsky, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol, 2000. **132**: p. 365-86.

203. Turner, S.D., *qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots*. bioRxiv, 2014.
204. Aziz, R.K., et al., *The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 75.
205. Li, H., et al., *The Sequence Alignment/Map format and SAMtools*. Bioinformatics, 2009. **25**(16): p. 2078-9.
206. Kaya, H., et al., *SCCmecFinder, a Web-Based Tool for Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome mec in Staphylococcus aureus Using Whole-Genome Sequence Data*. mSphere, 2018. **3**(1).
207. Ng, P.C. and S. Henikoff, *Predicting deleterious amino acid substitutions*. Genome Res, 2001. **11**(5): p. 863-74.
208. Becker, L., et al., *Whole Genome Sequence Analysis of CTX-M-15 Producing Klebsiella Isolates Allowed Dissecting a Polyclonal Outbreak Scenario*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 322.
209. Bolger, A.M., M. Lohse, and B. Usadel, *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data*. Bioinformatics, 2014. **30**(15): p. 2114-20.
210. Koboldt, D.C., et al., *VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing*. Genome Res, 2012. **22**(3): p. 568-76.
211. Halbedel, S., et al., *Whole-Genome Sequencing of Recent Listeria monocytogenes Isolates from Germany Reveals Population Structure and Disease Clusters*. J Clin Microbiol, 2018. **56**(6).
212. Weber, R.E., et al., *Comparative evaluation of VITEK(R) 2 and three commercial gradient strip assays for daptomycin susceptibility testing of Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother, 2017. **72**(11): p. 3059-3062.
213. Monk, I.R., et al., *Complete Bypass of Restriction Systems for Major Staphylococcus aureus Lineages*. MBio, 2015. **6**(3): p. e00308-15.
214. Iordanescu, S. and M. Surdeanu, *Two restriction and modification systems in Staphylococcus aureus NCTC8325*. J Gen Microbiol, 1976. **96**(2): p. 277-81.
215. Peschel, A., et al., *Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine*. J Exp Med, 2001. **193**(9): p. 1067-76.
216. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Clinical breakpoints - bacteria v 6.0*. 2016; http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
217. Fuchs, P.C., A.L. Barry, and S.D. Brown, *Evaluation of daptomycin susceptibility testing by Etest and the effect of different batches of media*. J Antimicrob Chemother, 2001. **48**(4): p. 557-61.
218. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
219. Tamura, K. and M. Nei, *Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees*. Mol Biol Evol, 1993. **10**(3): p. 512-26.
220. Letunic, I. and P. Bork, *Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(W1): p. W242-5.
221. Devlin, B. and K. Roeder, *Genomic control for association studies*. Biometrics, 1999. **55**(4): p. 997-1004.
222. Ng, P.C. and S. Henikoff, *SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3812-4.
223. Banerjee, S., et al., *Assume nothing! Staphylococcus aureus resistance to daptomycin may occur in patients not previously exposed to daptomycin or glycopeptides*. Int J Antimicrob Agents, 2016. **47**(5): p. 418-9.
224. Mishra, N.N., et al., *Reduced susceptibility to host-defense cationic peptides and daptomycin coemerge in methicillin-resistant Staphylococcus aureus from daptomycin-naïve bacteremic patients*. J Infect Dis, 2012. **206**(8): p. 1160-7.
225. Jorgensen, J.H. and S.A. Crawford, *Assessment of two commercial susceptibility test methods for determination of daptomycin MICs*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(6): p. 2126-9.

226. Sader, H.S., P.R. Rhomberg, and R.N. Jones, *Nine-hospital study comparing broth microdilution and Etest method results for vancomycin and daptomycin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(7): p. 3162-5.
227. Keel, R.A., et al., *Correlation between vancomycin and daptomycin MIC values for methicillin-susceptible and methicillin-resistant Staphylococcus aureus by 3 testing methodologies*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010. **68**(3): p. 326-9.
228. Koeth, L.M. and J.M. DiFranco, *Comparison of daptomycin Etest MICs on Mueller Hinton, IsoSensitest and brain heart infusion agars from Europe against 20 Staphylococcus aureus isolates*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010. **29**(10): p. 1261-4.
229. Friedrich, L., et al., *Evidence for daptomycin Etest lot-related MIC elevations for Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009. **65**(3): p. 306-11.
230. Stefani, S., et al., *Insights and clinical perspectives of daptomycin resistance in Staphylococcus aureus: A review of the available evidence*. Int J Antimicrob Agents, 2015. **46**(3): p. 278-89.
231. Farhat, M.R., et al., *A phylogeny-based sampling strategy and power calculator informs genome-wide associations study design for microbial pathogens*. Genome Med, 2014. **6**(11): p. 101.
232. Shapiro, B.J., et al., *Looking for Darwin's footprints in the microbial world*. Trends in Microbiology, 2009. **17**(5): p. 196-204.
233. Price, A.L., et al., *Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies*. Nat Genet, 2006. **38**(8): p. 904-9.
234. Mishra, N.N., et al., *Differential Adaptations of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus to Serial In Vitro Passage in Daptomycin: Evolution of Daptomycin Resistance and Role of Membrane Carotenoid Content and Fluidity*. Int J Microbiol, 2012. **2012**: p. 683450.
235. Mishra, N.N., et al., *Analysis of cell membrane characteristics of in vitro-selected daptomycin-resistant strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(6): p. 2312-8.
236. Chen, F.J., et al., *Effect of a Point Mutation in mprF on Susceptibility to Daptomycin, Vancomycin, and Oxacillin in an MRSA Clinical Strain*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 1086.
237. Yang, S.J., et al., *Impact of Multiple Single-Nucleotide Polymorphisms Within mprF on Daptomycin Resistance in Staphylococcus aureus*. Microb Drug Resist, 2018.
238. Hachmann, A.B., et al., *Reduction in membrane phosphatidylglycerol content leads to daptomycin resistance in Bacillus subtilis*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(9): p. 4326-37.
239. Arias, C.A., et al., *Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in enterococci*. N Engl J Med, 2011. **365**(10): p. 892-900.
240. Palmer, K.L., et al., *Genetic basis for daptomycin resistance in enterococci*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(7): p. 3345-56.
241. Wichelhaus, T.A., et al., *Biological cost of rifampin resistance from the perspective of Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(11): p. 3381-5.
242. Cui, L., et al., *Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(1): p. 5-14.
243. Mwangi, M.M., et al., *Tracking the in vivo evolution of multidrug resistance in Staphylococcus aureus by whole-genome sequencing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(22): p. 9451-6.
244. Howden, B.P., et al., *Evolution of multidrug resistance during Staphylococcus aureus infection involves mutation of the essential two component regulator WalkR*. PLoS Pathog, 2011. **7**(11): p. e1002359.
245. Mishra, N.N., et al., *Emergence of daptomycin resistance in daptomycin-naïve rabbits with methicillin-resistant Staphylococcus aureus prosthetic joint infection is associated with resistance to host defense cationic peptides and mprF polymorphisms*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71151.
246. David, M.Z. and R.S. Daum, *Treatment of Staphylococcus aureus Infections*. Curr Top Microbiol Immunol, 2017. **409**: p. 325-383.
247. MacArthur, D.G., et al., *Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease*. Nature, 2014. **508**(7497): p. 469-76.

- 248. Cameron, D.R., et al., *Impact of daptomycin resistance on Staphylococcus aureus virulence*. Virulence, 2015. **6**(2): p. 127-31.
- 249. Price, A.L., et al., *New approaches to population stratification in genome-wide association studies*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(7): p. 459-63.
- 250. McGuinness, W.A., N. Malachowa, and F.R. DeLeo, *Vancomycin Resistance in Staphylococcus aureus*. Yale J Biol Med, 2017. **90**(2): p. 269-281.
- 251. Ince, D. and D.C. Hooper, *Mechanisms and frequency of resistance to gatifloxacin in comparison to AM-1121 and ciprofloxacin in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(10): p. 2755-64.
- 252. Deplano, A., et al., *Association of mutations in grlA and gyrA topoisomerase genes with resistance to ciprofloxacin in epidemic and sporadic isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(9): p. 2023-5.
- 253. Knight, G.M., et al., *Shift in dominant hospital-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (HA-MRSA) clones over time*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(10): p. 2514-22.
- 254. Layer, F., et al., *Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von MRSA in Deutschland – Update 2015/2016*. Epidemiologisches Bulletin, 2018. **5**: p. 57-62.
- 255. Kelley, W.L., et al., *Missense mutations in PBP2A Affecting ceftaroline susceptibility detected in epidemic hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus clonotypes ST228 and ST247 in Western Switzerland archived since 1998*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(4): p. 1922-30.
- 256. Argudin, M.A., et al., *In vitro activity of ceftaroline against clinical Staphylococcus aureus isolates collected during a national survey conducted in Belgian hospitals*. J Antimicrob Chemother, 2018.
- 257. Greninger, A.L., et al., *Whole-Genome Sequencing of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Resistant to Fifth-Generation Cephalosporins Reveals Potential Non-mecA Mechanisms of Resistance*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0149541.
- 258. Chan, L.C., et al., *Ceftobiprole- and ceftaroline-resistant methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(5): p. 2960-3.
- 259. Clark, C., et al., *Multistep resistance development studies of ceftaroline in gram-positive and -negative bacteria*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(5): p. 2344-51.

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AMP	Ampicillin
ASS	Aminosäuresubstitution
bp	Basenpaare
BSI	Blutstrominfektionen
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Kalziumchlorid
CAMP	kationisch antimikrobielle Peptide (engl. <i>cationic antimicrobial peptide</i>)
CA-MRSA	<i>Community-Acquired</i> MRSA
CC	Klonaler Komplex (engl. <i>clonal complex</i>)
CFU	Koloniebildende Einheit (engl. <i>colony forming units</i>)
CIP	Ciprofloxacin
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMH	Cochran-Mantel-Haenszel Test
CPT	Ceftarolin
CPT-R	Ceftarolin-resistent
CPT-S	Ceftarolin-empfindlich
DAP	Daptomycin
DAP-R	Daptomycin-resistent
DAP-S	Daptomycin-empfindlich
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
ddNTP	Di-Desoxyribonukleotid
DLV	Doppellokus-Variante (engl. <i>double locus variant</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED	Exklusionsdistanz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FOX	Cefoxitin
GC	Genomic Control
gDNA	genomische DNA

GEN	Gentamicin
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien
H ₃ BO ₃	Borsäure
HA-MRSA	Krankenhaus-assoziierte MRSA (engl. <i>hospital associated</i> MRSA)
HF	<i>High-Fidelity</i>
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin 2
KAN	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kV	Kilovolt
LA-MRSA	<i>Livestock</i> -assoziierte MRSA (engl. <i>livestock associated</i> MRSA)
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LD	Kopplungsungleichgewicht (engl. <i>linkage disequilibrium</i>)
LIN	Linezolid
L-PG	Lysyl-Phosphatidylglycerol
LPS	Lipopolysaccharide
LRT	Likelihood-Ratio-Test
LV	Lokusvariante
MAF	Minor-Allel-Frequenz
MBV	Mikrobouillon-Verdünnung
MDS	Multidimensionale Skalierung
MDV	Mikrobouillondilutionsverfahren
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGE	mobile genetische Elemente
MH	Müller Hinton
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MLST	Multi-Locus-Sequenz-Typisierung
MRSA	Methicillin-resistente <i>S. aureus</i>
MSCRAMMs	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
MSSA	Methicillin-empfindliche <i>S. aureus</i>
Na ⁺	Natrium-Ionen
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
nPBD	nicht-Penicillin-bindenden Domäne
NRZ	Nationales Referenzzentrum
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i>)

OS-MRSA	Oxacillin-empfindliche MRSA (engl. <i>oxacillin susceptible MRSA</i>)
OXA	Oxacillin
PBD	Penicillin-bindenden Domäne
PBP2a	Penicillin-bindendes Protein 2a
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl. <i>principal component analysis</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
pDNA	plasmidale DNA
PG	Phosphatidylglycerol
PVL	Panton-Valentine-Leukozidin
Q-Q	Quantile-Quantile
R/M-System	Restriktions-Modifikations-System
RAM	Rifampicin
RFPL	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCCmec	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
SDM	ortsspezifische Mutagenese (engl. <i>site-directed mutagenesis</i>)
SEER	<i>Sequence Element Enrichment Analysis</i>
SIFT	<i>Sorting Intolerant from Tolerant</i>
SLV	Einzellokus-Variante (engl. <i>single locus variant</i>)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SOC	<i>Super Optimal Broth</i>
Spa	Protein A
ST	Sequenztyp
ST R	Streptomycin
SXT	Sulfmethoxazol/Trimethoprim
T	Transformationseffizienz
T _A	Annealing-Temperatur
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Tryptic-Soy-Bouillon
TSST -1	Toxic-Shock-Syndrom Toxin 1
VAN	Vancomycin

VISA	Vancomycin-intermediär empfindliche <i>S. aureus</i>
WGS	Ganzgenomsequenzierung (engl. <i>whole genome sequencing</i>)
WT	Wildtyp
WTA	Zellwand-Teichonsäuren (engl. <i>cell-wall teichoic acid</i>)
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
λ_{GC}	genomischer Inflationsfaktor Lamda
Ω	Ohm
μF	Mikrofarad

Anhang

Anhang 1 | Bakterielle Isolate für die Evaluierung kommerzieller Testsysteme zur Bestimmung der DAP Empfindlichkeit

Isolat	Herkunft (Bundesland)	Resistenzprofil ^a	CC/ST ^{b,c}	MHK OXA	mecA	MHK VAN	DAP Empfindlichkeitstestung				
							MBV ^c MHK (mg/L)	Etest [®] MHK (mg/L)	M.I.C.Evaluator [®] MHK (mg/L)	Daptomycin MIC test strip [®] MHK (mg/L)	VITEK 2 MHK (mg/L)
11-01772	Berlin	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	CC22	≥4.00	+	≤1.00	0,25	0,19	0,50	0,19	0,50
12-03108	Bayern	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	CC5	≥4.00	+	≤1.00	0,25	0,25	0,50	0,38	0,25
12-03784	Mecklenburg Vorpommern	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	CC22	≥4.00	+	≤1.00	0,25	0,19	0,50	0,25	0,50
12-03831-2	Sachsen Anhalt	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	CC22	≥4.00	+	≤1.00	0,25	0,19	0,50	0,19	0,25
13-00896	Hamburg	PEN, CIP	CC8	0,50	-	≤1.00	0,25	0,25	0,50	0,50	0,50
13-01337	Mecklenburg Vorpommern	PEN	CC45	0,50	-	≤1.00	0,25	0,25	0,50	0,25	0,50
13-03184	Nordrhein-Westfalen	PEN, OXA, FUS	CC5	≥4.00	+	≤1.00	0,25	0,38	0,75	0,50	0,50
14-00046	Brandenburg	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	CC22	≥4.00	+	≤1.00	0,25	0,19	0,50	0,38	0,50
14-00160	Baden-Württemberg	PEN, OXA, CIP, MFL	CC22	≥4.00	+	≤1.00	0,25	0,25	0,50	0,25	0,50
10-01970	Baden-Württemberg	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MUP, LNZ, MFL	CC5	≥4.00	+	≤1.00	0,50	0,25	0,50	0,38	0,50
11-02222	Berlin	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	CC22	≥4.00	+	≤1.00	0,50	0,38	0,50	0,38	0,50
11-02779	Bayern	PEN, OXA, CIP, MFL	CC8	≥4.00	+	≤1.00	0,50	0,25	0,38	0,13	0,50
13-00373	Sachsen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	ST225	≥4.00	+	≤1.00	0,50	0,25	0,50	0,25	0,50
13-00543	Nordrhein-Westfalen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	CC22	≥4.00	+	≤1.00	0,50	0,25	0,50	0,38	0,50
13-00983	Nordrhein-Westfalen	PEN, ERY	ST7	0,50	-	≤1.00	0,50	0,50	1,00	0,75	0,50
13-01132	Nordrhein-Westfalen	ERY	ST398	≤0,25	-	≤1.00	0,50	0,38	0,50	0,38	1,00
13-01538	Nordrhein-Westfalen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, FUS, MFL	ST225	≥4.00	+	≤1.00	0,50	0,25	0,75	0,50	0,50
13-03524	Brandenburg	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	CC22	≥4.00	+	≤1.00	0,50	0,19	0,25	0,25	0,50
13-03767	Baden-Württemberg	PEN, OXA	ST45	≥4.00	+	≤1.00	0,50	0,38	0,75	0,38	0,25
12-00014	Hessen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MUP, MFL	ST225	≥4.00	+	≤1.00	1,00	0,50	1,00	0,75	0,50
13-01676	Bayern	PEN, OXA, ERY, CIP, MFL	ST225	≥4.00	+	≤1.00	1,00	1,50	2,00	1,00	2,00
08-02376	Schleswig Holstein	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	CC5	≥4.00	+	≤1.00	2,00	3,00	4,00	4,00	4,00
10-02504-2	Sachsen Anhalt	PEN, OXA, CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	≤1.00	2,00	1,50	2,00	2,00	4,00
10-02516	Sachsen Anhalt	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	≤1.00	2,00	1,50	2,00	1,50	4,00
11-00040	Schleswig Holstein	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	ST225	≥4.00	+	≤1.00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00
12-03920	Hessen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MUP i, MFL, DAP	ST225	≥4.00	+	≤1.00	2,00	2,00	3,00	2,00	4,00
13-01325	Bayern	PEN, CIP, MFL, DAP	CC22	≤0,25	-	≤1.00	2,00	2,00	2,00	3,00	4,00
13-01740	Nordrhein-Westfalen	PEN, OXA, CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	≤1.00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00
13-02338	Baden-Württemberg	ERY, DAP	ST398	≤0,25	-	≤1.00	2,00	2,00	3,00	3,00	4,00
13-02671	Saarland	CIP, MFL, DAP	CC8	≤0,25	-	≤1.00	2,00	2,00	3,00	3,00	4,00
13-02987-1	Bayern	PEN, DAP	CC45	1,00	-	2,00	2,00	2,00	3,00	3,00	4,00
13-03385	Sachsen Anhalt	PEN, ERY, CLI, DAP	ST7	≤0,25	-	≤1.00	2,00	4,00	6,00	6,00	4,00
13-03534	Baden-Württemberg	ERY, DAP	n.b.	≤0,25	-	≤1.00	2,00	2,00	3,00	2,00	4,00
13-03876	Niedersachsen	PEN, OXA, GEN, DAP	CC22	≥4.00	+	≤1.00	2,00	1,50	2,00	2,00	4,00
13-04050	Nordrhein-Westfalen	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, FUS, MFL, DAP	ST225	≥4.00	+	≤1.00	2,00	3,00	3,00	3,00	4,00
13-04349	Nordrhein-Westfalen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, RAM, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	2,00	2,00	1,50	2,00	1,50	4,00
13-04448	Bayern	PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, DAP	ST225	≥4.00	+	≤1.00	2,00	2,00	3,00	3,00	4,00
13-04847	Mecklenburg Vorpommern	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	ST225	≥4.00	+	≤1.00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00
14-00449	Brandenburg	DAP	CC30	≤0,25	-	2,00	2,00	1,50	2,00	1,50	4,00
14-01116	Mecklenburg Vorpommern	PEN, DAP	n.b.	0,50	-	≤1.00	2,00	3,00	4,00	2,00	4,00
14-01433-1	Baden-Württemberg	PEN, CIP, DAP	n.b.	≤0,25	-	2,00	2,00	1,50	2,00	1,50	4,00
14-01433-2	Baden-Württemberg	PEN, CIP, DAP	n.b.	≤0,25	-	2,00	2,00	2,00	3,00	2,00	0,50
14-01459	Bayern	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, FUS, MFL, DAP	CC5	≥4.00	+	2,00	2,00	3,00	3,00	2,00	4,00
14-01979	Sachsen	PEN, RAM, DAP	ST7	0,50	-	≤1.00	2,00	1,50	2,00	1,00	4,00
14-02034	Brandenburg	PEN, DAP	CC30	≤0,25	-	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00
14-02100	Niedersachsen	PEN, DAP	CC45	0,50	-	2,00	2,00	2,00	4,00	2,00	4,00
14-02102	Bayern	PEN, DAP	CC45	0,50	-	≤1.00	2,00	1,50	2,00	3,00	4,00
14-02220	Sachsen	PEN, CIP, MFL, DAP	CC22	0,50	-	≤1.00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00
14-02221	Sachsen	PEN, DAP	CC45	0,50	-	≤1.00	2,00	2,00	3,00	1,50	4,00
14-02223	Sachsen	GEN, DAP	ST101	0,50	-	≤1.00	2,00	2,00	3,00	3,00	4,00
14-02228	Sachsen	PEN, GEN, FUS, DAP	CC45	0,50	-	≤1.00	2,00	2,00	3,00	2,00	4,00
14-02229	Sachsen	PEN, TET, FUS, DAP	ST7	0,50	-	≤1.00	2,00	2,00	3,00	3,00	4,00
14-02264	Sachsen	PEN, CIP, MFL, DAP	CC22	0,50	-	≤1.00	2,00	2,00	3,00	2,00	4,00
14-02518	Schleswig Holstein	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	≤1.00	2,00	2,00	3,00	2,00	4,00
14-02720	Brandenburg	GEN, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	CC8	≤0,25	-	2,00	2,00	3,00	3,00	3,00	4,00
14-02721	Brandenburg	GEN, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	CC8	≤0,25	-	2,00	2,00	2,00	3,00	3,00	4,00
14-02908	Sachsen Anhalt	PEN, DAP	CC30	≤0,25	-	≤1.00	2,00	2,00	2,00	1,50	2,00
14-03011	Hessen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	ST225	≥4.00	+	≤1.00	2,00	2,00	4,00	3,00	4,00
14-03365	Nordrhein-Westfalen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	≤1.00	2,00	1,50	2,00	2,00	4,00
14-03706	Bayern	PEN, DAP	CC8	≤0,25	-	≤1.00	2,00	3,00	4,00	3,00	4,00
15-00054	Hessen	PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, DAP	CC5	≥4.00	+	2,00	2,00	3,00	4,00	3,00	4,00
15-00397	Baden-Württemberg	CIP, MFL, DAP	ST15	≤0,25	-	≤1.00	2,00	3,00	4,00	3,00	4,00
15-01052	Bayern	DAP	CC1	0,50	-	≤1.00	2,00	1,50	2,00	1,50	4,00
15-01053	Bayern	DAP	ST15	≤0,25	-	≤1.00	2,00	1,50	2,00	1,50	2,00
15-01064	Schleswig Holstein	PEN, DAP	CC45	0,50	-	2,00	2,00	1,50	3,00	1,50	4,00
15-01169	Brandenburg	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	≤1.00	2,00	3,00	4,00	3,00	4,00
15-01202	Sachsen Anhalt	PEN, ERY, DAP	CC30	≤0,25	-	≤1.00	2,00	3,00	4,00	3,00	4,00
15-01381	Schleswig Holstein	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	ST225	≥4.00	+	≤1.00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00
15-01427	Brandenburg	PEN, OXA, CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	≤1.00	2,00	1,50	2,00	3,00	4,00
08-02052	Sachsen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	≤1.00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
09-01199	Sachsen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, RAM, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	2,00	4,00	3,00	4,00	4,00	4,00
09-02538	Schleswig Holstein	PEN, OXA, CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	≤1.00	4,00	3,00	4,00	4,00	4,00
10-00109-1	Baden-Württemberg	PEN, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	ST225	2,00	+	2,00	4,00	2,00	2,00	1,50	4,00
10-00109-2	Baden-Württemberg	PEN, OXA, ERY, VAN, TPL i, CIP, MFL, DAP	ST225	≥4.00	+	4,00	4,00	2,00	2,00	2,00	4,00
10-00785	Sachsen Anhalt	PEN, OXA, CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	≤1.00	4,00	3,00	3,00	3,00	4,00
10-02824	Berlin	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MUP, MFL, DAP	ST225	≥4.00	+	2,00	4,00	3,00	4,00	3,00	4,00
11-00260	Baden-Württemberg	PEN, OXA, CIP, RAM, MFL, DAP	CC8	≥4.00	+	≤1.00	4,00	2,00	3,00	2,00	4,00
11-03269	Berlin	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	2,00	4,00	3,00	3,00	3,00	4,00
11-03623	Berlin	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	2,00	4,00	3,00	4,00	3,00	4,00
13-00556	Nordrhein-Westfalen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, RAM, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	≤1.00	4,00	2,00	2,00	1,50	4,00

Isolat	Herkunft (Bundesland)	Resistenzprofil ^a	CC/ST ^{b,e}	MHK OXA	mecA	MHK VAN	DAP Empfindlichkeitstestung				
							MBV ^c MHK (mg/L)	Etest ⁺ MHK (mg/L)	M.I.C.Evaluator ⁺ MHK (mg/L)	Daptomycin MIC test strip ⁺ MHK (mg/L)	VITEK 2 MHK (mg/L)
13-03523-2	Brandenburg	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	≤1.00	4,00	3,00	3,00	3,00	4,00
13-03532	Baden-Württemberg	ERY, DAP	ST78	≤0.25	-	≤1.00	4,00	2,00	2,00	3,00	4,00
13-03831	Sachsen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	ST225	≥4.00	+	2,00	4,00	3,00	4,00	3,00	4,00
13-04153	Baden-Württemberg	ERY, DAP	ST78	≤0.25	-	≤1.00	4,00	2,00	3,00	3,00	4,00
13-04344	Nordrhein-Westfalen	PEN, OXA, ERY, CIP, FUS, MFL, DAP	CC5	≥4.00	+	≤1.00	4,00	3,00	4,00	3,00	4,00
14-00724	Hessen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	ST225	≥4.00	+	2,00	4,00	3,00	3,00	3,00	4,00
14-00753	Mecklenburg Vorpommern	PEN, GEN, ERY, DAP	CC8	0,50	-	2,00	4,00	3,00	4,00	3,00	4,00
14-00888	Baden-Württemberg	TPL, DAP	ST101	≤0.25	-	2,00	4,00	4,00	4,00	3,00	4,00
14-01258	Brandenburg	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	≤1.00	4,00	2,00	3,00	4,00	4,00
14-01371	Mecklenburg Vorpommern	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	≤1.00	4,00	3,00	4,00	4,00	4,00
14-01427	Bayern	PEN, CIP, MFL, DAP, COX	CC8	≤0.25	-	≤1.00	4,00	2,00	3,00	3,00	4,00
14-02151	Nordrhein-Westfalen	PEN, OXA, ERY, CLI, TET, CIP, SXT, MFL, DAP	ST239	≥4.00	+	≤1.00	4,00	2,00	2,00	2,00	4,00
14-02510	Brandenburg	CIP, DAP	CC8	≤0.25	-	2,00	4,00	3,00	4,00	3,00	4,00
14-03170	Sachsen	PEN, DAP	ST15	0,50	-	≤1.00	4,00	2,00	3,00	4,00	4,00
14-03171	Sachsen	PEN, OXA, CIP, MFL, DAP	ST225	≥4.00	+	≤1.00	4,00	3,00	4,00	4,00	4,00
14-03244	Mecklenburg Vorpommern	PEN, OXA, CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	≤1.00	4,00	2,00	3,00	3,00	4,00
15-00345	Sachsen	CIP, MFL, DAP	CC8	≤0.25	-	2,00	4,00	3,00	4,00	4,00	>4.00
15-00434	Baden-Württemberg	PEN, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	CC8	0,50	+	2,00	4,00	4,00	6,00	6,00	4,00
15-00574	Nordrhein-Westfalen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	≤1.00	4,00	2,00	4,00	4,00	4,00
15-00711	Sachsen Anhalt	DAP	CC45	≤0.25	-	≤1.00	4,00	2,00	3,00	2,00	4,00
15-00752	Bayern	PEN, DAP	ST15	≤0.25	-	≤1.00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
15-01368	Schleswig Holstein	CIP, DAP	CC45	≤0.25	-	≤1.00	4,00	1,50	2,00	1,50	4,00
15-01414	Brandenburg	DAP	CC5	≤0.25	-	≤1.00	4,00	2,00	3,00	3,00	4,00
12-01739	Niedersachsen	PEN, OXA, ERY, CLI, VAN, TPL , CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	4,00	8,00	4,00	4,00	6,00	>4.00
12-01740	Niedersachsen	PEN, OXA, ERY, CLI, VAN, TPL , CIP, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	4,00	8,00	6,00	6,00	8,00	>4.00
12-03872	Bayern	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, MUP, MFL, DAP	CC5	≥4.00	+	≤1.00	8,00	4,00	4,00	6,00	4,00
15-01065	Berlin	PEN, OXA, ERY, CLI, VAN , CIP, RAM, MFL, DAP	CC22	≥4.00	+	4,00	8,00	4,00	6,00	4,00	>4.00

hellgrau: DAP-S, dunkelgrau: DAP-R

^aPenicillin, PEN; Oxacillin, OXA; Cefoxitin, COX; Chosphomycin, PHO; Gentamicin, GEN; Linezolid, LZD; Erythromycin, ERY; Clindamycin, CLI; Tetracycline, TET; Tigecyclin, TGC; Vancomycin, VAN; Teicoplanin, TPL; Ciprofloxacin, CIP; Moxifloxacin, MFL; Mupirocin, MUP; Daptomycin, DAP; Fusidinsäure, FUS; Rifampicin, RAM; Sulfamethoxazol / Trimethoprim, SXT

^bMLST klonaler Komplex/klonale Linie, abgeleitet vom *spa*-Typ

^cMBV, Mikrobouillonverdünnung

^en.b., nicht bestimmt

Anhang 2 | Bakterielle Isolate für die Identifizierung DAP-R assoziierter SNPs

Isolat	Herkunft (Stadt)	Resistenzprofil ^a	ST ^b	MBV ^c MHK (mg/L)	MBV MHK Interpretation ^d
09-01199	Leipzig	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, RAM, MFL, DAP, OxaSu	22	4	R
08-02052	Leipzig	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP, OxaSu	22	4	R
08-02376	Süsel	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP, OxaSu	225	2	R
09-02538	Eutin	PEN, OXA, CIP, MFL, DAP, OxaSu	22	4	R
10-00109-2	Heidelberg	PEN, OXA, ERY, TPL i, CIP, MFL, DAP, OxaSu	225	4	R
10-00785	Wernigerode	PEN, OXA, CIP, MFL, DAP, OxaSu	22	4	R
10-02824	Berlin	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MUP, MFL, DAP, OxaSu	225	4	R
11-00260	Tübingen	PEN, OXA, CIP, RAM, MFL, DAP, OxaSu	8	4	R
11-03269	Berlin	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP, OxaSu	22	4	R
11-03623	Berlin	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP, OxaSu	22	4	R
12-01739	Braunschweig	PEN, OXA, ERY, CLI, VAN, TPL, CIP, MFL, DAP, OxaSu	22	8	R
12-01740	Braunschweig	PEN, OXA, ERY, CLI, VAN, TPL, CIP, MFL, DAP, OxaSu	22	8	R
12-03872	Nürnberg	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, MUP, MFL, DAP, OxaSu	228	8	R
12-03920	Bad Wildungen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MUP i, MFL, DAP, OxaSu	225	2	R
13-00556	Münster	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, RAM, MFL, DAP, OxaSu	22	4	R
13-02338	Tübingen	ERY, DAP	398	2	R
13-02671	Homburg/Saar	CIP, MFL, DAP	8	2	R
13-02987-1	Bayreuth	PEN, OXA, SXT,	4409	2	R
13-03385	Magdeburg	PEN, ERY, CLI, DAP	7	2	R
13-03523-2	Beelitz-Heilstätten	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP, OxaSu	22	4	R
13-03532	Tübingen	ERY, DAP	78	4	R
13-03831	Leipzig	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP, OxaSu	225	4	R
13-04050	Leverkusen	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, FUS, MFL, DAP, OxaSu	225	2	R
13-04153	Tübingen	ERY, DAP	78	4	R
13-04344	Leverkusen	PEN, OXA, ERY, CIP, FUS, MFL, DAP, OxaSu	225	4	R
13-04448	Bayreuth	PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, DAP, OxaSu	225	2	R
14-00724	Kassel	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP, COX, OxaSu	225	4	R
14-00753	Schwerin	PEN, GEN, ERY, DAP	8	4	R
14-00888	Heidelberg	TPL, DAP	101	4	R
14-01258	Hennigsdorf	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP, COX, OxaSu	22	4	R
14-01371	Greifswald	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP, COX, OxaSu	22	4	R
14-01459	München	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, FUS, MFL, DAP, COX, OxaSu	5	2	R
14-02100	Göttingen	PEN, DAP	45	2	R
14-02151	Münster	PEN, OXA, ERY, CLI, TET, CIP, SXT, MFL, DAP, COX, OxaSu	241	4	R
14-02223	Dresden	GEN, DAP	101	2	R
14-02229	Dresden	PEN, TET, FUS, DAP	7	2	R
14-02510	Hennigsdorf	CIP, DAP	8	4	R
14-02720	Hennigsdorf	GEN, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	8	2	R
14-03011	Bad Wildungen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP, COX, OxaSu	225	2	R
14-03170	Dresden	PEN, DAP	15	4	R
14-03171	Dresden	PEN, OXA, CIP, MFL, DAP, COX, OxaSu	225	4	R
14-03244	Frankfurt am Main	PEN, OXA, CIP, MFL, DAP, COX, OxaSu	22	4	R
14-03706	Bayreuth	PEN, DAP	8	2	R
15-00345	Chemnitz	CIP, MFL, DAP	8	4	R
15-00434	Tübingen	PEN, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP, COX, OxaSu	8	4	R
15-00574	Rheinbach	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP, COX, OxaSu	22	4	R
15-00711	Magdeburg	DAP	45	4	R
15-00752	Bayreuth	PEN, DAP	4410	4	R
15-01065	Berlin	PEN, OXA, ERY, CLI, VAN, CIP, RAM, MFL, DAP, COX, OxaSu	22	8	R
15-01169	Hennigsdorf	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP, COX, OxaSu	22	2	R
15-01202	Magdeburg	PEN, ERY, DAP	30	2	R
15-01414	Hennigsdorf	DAP	4411	4	R
09-01101	Leipzig	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, OxaSu	22	0,25	S
08-00141	Süsel	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, OxaSu	225	0,5	S
09-00347	Eutin	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, OxaSu	22	0,25	S
10-01970	Heidelberg	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MUP, LN2, MFL, OxaSu	225	0,5	S

Isolat	Herkunft (Stadt)	Resistenzprofil ^a	ST ^b	MBV ^c DAP MHK (mg/L)	MBV DAP MHK Interpretation ^d
10-01243	Wernigerode	PEN, OXA, CIP, MFL, OxaSu	22	0,25	S
10-00410	Berlin	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, OxaSu	5	0,25	S
11-02779	Murnau	PEN, OXA, CIP, MFL, OxaSu	8	0,5	S
11-01772	Berlin	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, OxaSu	22	0,25	S
11-02222	Berlin	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, OxaSu	22	0,5	S
12-03784	Greifswald	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, OxaSu	22	0,25	S
12-03831-2	Halle	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, OxaSu	22	0,25	S
12-03108	Nürnberg	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, OxaSu	225	0,25	S
12-00014	Bad Wildungen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MUP, MFL, OxaSu	225	1	S
13-00543	Münster	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, OxaSu	22	0,5	S
13-01132	Münster	ERY	398	0,5	S
13-00896	Hamburg	PEN, CIP	8	0,25	S
13-01337	Greifswald	PEN	4408	0,25	S
13-00983	Köln	PEN, ERY	7	0,5	S
13-03524	Beelitz-Heilstätten	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, OxaSu	22	0,5	S
13-00373	Leipzig	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, OxaSu	225	0,25	S
13-01538	Leverkusen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, FUS, MFL, OxaSu	225	0,5	S
13-03184	Leverkusen	PEN, OXA, FUS, OxaSu	5	0,25	S
13-01676	Bayreuth	PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, OxaSu	225	1	S
14-00490	Halberstadt	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, COX, OxaSu	225	0,5	S
14-00561	Bochum	PEN, ERY, CLI, CIP, MFL	8	0,5	S
13-03767	Frankfurt am Main	PEN, OXA, OxaSu	45	0,5	S
14-00046	Hennigsdorf	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, COX, OxaSu	22	0,25	S
14-00409	Bochum	PEN, OXA, CIP, MFL, COX, OxaSu	22	0,25	S
14-01760	München	PEN, OXA, FUS, COX, OxaSu	149	0,5	S
14-00671	Wernigerode	sensibel	45	0,25	S
14-02152-2	Münster	PEN, OXA, GEN, ERY, TET, CIP, SXT, MFL, COX, OxaSu	239	0,5	S
14-01705	Dresden	PEN, ERY	7	0,5	S
14-02912	Osnabrück	PEN	8	0,5	S
14-02943	Lübeck	PEN, ERY	8	0,5	S
14-00535	Bad Wildungen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, COX, OxaSu	225	0,5	S
14-01017	Dresden	sensibel	15	0,5	S
14-03283	Kassel	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, COX, OxaSu	225	0,5	S
14-00160	Frankfurt am Main	PEN, OXA, CIP, MFL, COX, OxaSu	22	0,25	S
14-00482	Mannheim	PEN	8	0,25	S
15-00702	Oldenburg	PEN, ERY, CIP, MFL	8	0,5	S
15-00531	Tübingen	PEN	8	0,5	S
15-00387	Göttingen	PEN	45	0,5	S
15-00382	Greifswald	PEN	15	0,5	S
15-00826	Berlin	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, COX, OxaSu	22	0,5	S
15-00680	Halberstadt	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, COX, OxaSu	22	0,5	S
15-01873	Magdeburg	PEN, ERY	30	0,5	S
15-01303	München	PEN, OXA, FUS, COX, OxaSu	149	0,5	S

hellgrau: DAP-S, dunkelgrau: DAP-R

^aPenicillin, PEN; Oxacillin, OXA; Cefoxitin, COX; Chosphomycin, PHO; Gentamicin, GEN; Linezolid, LZD; Erythromycin, ERY; Clindamycin, CLI; Tetracycline, TET; Tigecyclin, TGC; Vancomycin, VAN; Teicoplanin, TPL; Ciprofloxacin, CIP; Moxifloxacin, MFL; Mupirocin, MUP; Daptomycin, DAP; Fusidinsäure, FUS; Rifampicin, RAM; Sulfamethoxazol / Trimethoprim, SXT

^bMLST klonaler Komplex/klonale Linie nach Ridom SeqSphere+

^cMBV, Mikrobouillonverdünnung

^dMHK Interpretation nach EUCAST (klinische Grenzwerte - Bakterien v 5.0/v 6.0)

Anhang 3 | Bakterielle Isolate für die Identifizierung CPT-R assoziierter SNPs

Isolat	Herkunft (Stadt)	Resistenzprofil ^a	St ^b	MBV ^c CPT MHK (mg/L) 1. Testung	MBV CPT MHK (mg/L) 2. Testung	MBV CPT MHK (mg/L) 3. Testung	MBV CPT MHK Interpretation ^d	meCA	SCCmec ^e	OXA Resistenz
12-02278	Oldenburg	PEN, OXA, ERY, CIP, MFL	22	2	2	4	R	+	IV(2B)	R
12-02289	Wernigerode	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	22	2	2	4	R	+	IV(2B)	R
12-02755	Halle	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	22	2			R	+	IV(2B)	R
12-02846	Hamburg	PEN, OXA, CIP, MFL	22	2			R	+	IV(2B)	R
12-02895	Lübeck	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	22	2			R	+	IV(2B)	R
12-03081	Halberstadt	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	22	2			R	+	IV(2B)	R
12-03139	Singen	PEN, OXA, ERY, CLI, TET i, CIP, MFL	22	2			R	+	IV(2B)	R
12-03561-1	Bochum	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	22	2	2	2	R	+	IV(2B)	R
12-02600	Wernigerode	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	22	2	2		R	+	IV(2B)	R
12-02888	Rendsburg	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	22	2	2		R	+	IV(2B)	R
12-02956	Leipzig	PEN, OXA	30	2	2	2	R	+	IV(2B)	R
10-00729	Bad Berka	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, MFL	111	4			R	+	I(1B)	R
10-00777	Wernigerode	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, MFL	228	2	4		R	+	I(1B)	R
10-01257-2	Innsbruck	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, PHO, MFL	228	2			R	+	I(1B)	R
10-02919	Leipzig	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, MUP, MFL	111	4			R	+	I(1B)	R
10-00249	Ingelheim	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, MFL	111	1	4	8	R	+	I(1B)	R
10-01267	Innsbruck	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, MFL	111	1	4	4	R	+	I(1B)	R
10-01263	Innsbruck	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, MUP, PHO, MFL	228	2			R	+	I(1B)	R
11-00668	Heidelberg	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, MFL	228	2			R	+	I(1B)	R
12-02973	Bad Wildungen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	225	2	2		R	+	II(2A)	R
11-00453	Oldenburg	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, MUP, MFL	228	4			R	+	I(1B)	R
98-01155-2	Oberhausen	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, OxaSu	228	4	8		R	+	I(1B)	R
99-00653	Mönchengladbach	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, RAM, MUP i, OxaSu	228	4	4		R	+	none	R
12-00490	Rheinbach	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, RAM, MFL	111	4			R	+	I(1B)	R
11-02667	Eutin	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, MFL	111	4			R	+	I(1B)	R
12-00264	Rheinbach	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, MFL	111	4			R	+	I(1B)	R
12-02831	Rendsburg	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, MFL	228	4			R	+	I(1B)	R
02-03179	Oberhausen	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, MFL, OxaSu	228	2	4		R	+	I(1B)	R
12-02354	Bremerhaven	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	225	2	4		R	+	II(2A)	R
12-02813	Köln	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MUP, MFL	225	2	2	4	R	+	II(2A)	R
12-03094	Leverkusen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	225	2	2		R	+	II(2A)	R
12-03546	Oldenburg	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	225	2			R	+	II(2A)	R
12-02627	Murnau	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	225	4			R	+	II(2A)	R
12-03136	Frankfurt am Main	PEN, OXA	8	2	2		R	+	IV(2B)	R
14-01734	Ingolstadt	PEN, OXA, GEN, CIP, SXT, MFL, COX, OxaSu	113	8	4		R	+	IV(2B)	R
12-00567	Rheinbach	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, MFL	228	4	4		R	+	I(1B)	R
12-02057-2	Rendsburg	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, TET, CIP, RAM, MFL	239	4	4		R	+	III(3A)	R
12-03222	Oberhausen	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, TET, CIP, SXT, MFL	239	4			R	+	III(3A)	R
12-03317	Köln	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, TET, CIP, SXT, RAM, MFL	4407	4	4		R	+	III(3A)	R
12-02408-1	Lübeck	PEN, OXA, GEN, TET, CIP, RAM, MFL	239	4			R	+	III(3A)	R
12-03411	Münster	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, TET, TPL, CIP, RAM, PHO, MFL	1465	4	8		R	+	III(3A)	R
08-01162-2	Bad Wildungen	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, CIP, SXT, FUS, RAM, MFL, OxaSu	239	4	4		R	+	III(3A)	R
10-01507	Wernigerode	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, TET, CIP, SXT, MFL, OxaSu	239	2	2		R	+	III(3A)	R
12-01456-2	Berlin	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, TET, CIP, RAM, PHO, MFL, OxaSu	239	2	2		R	+	III(3A)	R
12-02461	Göttingen	PEN, OXA, CIP, MFL	22	1			S	+	IV(2B)	R
12-02856	Stuttgart	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	22	1			S	+	IV(2B)	R
16-03048	nicht aufgeführt	PEN, OXA, CIP, MFL, COX, OxaSu	22	1	1		S	+	IV(2B)	R
16-02541-1	Neukirchen	sensibel	22	0,25	0,25		S		none	S
15-01585	Berlin	sensibel	4406	0,125	0,5		S		none	S
10-00598	Halle	sensibel	22	0,125	0,25		S		none	S
11-02017	Bad Berka	sensibel	22	0,25	0,25		S		none	S
11-03477-1	Augsburg	sensibel	22	0,25	0,25		S		none	S
10-01482	Düsseldorf	sensibel	22	0,125	0,25		S		none	S
14-01528	Halberstadt	sensibel	22	0,25	0,25		S		none	S
12-03280	Berlin	PEN	30	1			S		none	S
06-00998	Hannover	PEN, OXA, FUS, OxaSu	5	0,5	1		S	+	I(1B)	R
06-01624	Wernigerode	PEN, GEN, CMP, CIP, MFL, OxaSu	5	0,5	1		S	+	I(1B)	R
12-02858-1	Göttingen	PEN, GEN, ERY, CIP, MUP, MFL i	5	0,5			S	+	I(1B)	S
10-03087	Bad Wildungen	PEN, OXA, ERY, CIP, FUS, MFL	5	0,5	0,5		S	+	I(1B)	R
12-03340	Kassel	sensibel	5	1			S		none	S
12-03341	Dortmund	PEN, OXA, ERY	5	1			S	+	IV(2B)	R
14-03505	Tübingen	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, COX, OxaSu	225	1	1		S	+	II(2A)	R
09-01718	Wernigerode	sensibel	5	0,125	0,25		S		none	S
09-03066	Lemgo	sensibel	5	0,125	0,25		S		none	S
10-00329	Leipzig	sensibel	146	0,125	0,25		S		none	S
12-03499	Berlin	PEN, OXA	5	1			S	+	IV(2B)	R
12-01857	Berlin	sensibel	5	0,125	0,125		S		none	S
14-01092	Wernigerode	sensibel	5	0,125	0,125		S		none	S
14-02900	Ritschenhausen	sensibel	5	0,125	0,25		S		none	S
16-02597	nicht aufgeführt	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, COX, OxaSu	4511	0,5	1		S	+	II(2A)	R
12-02427-1	Lübeck	PEN, ERY, CLI, CIP, MFL	225	0,5			S	+	II(2A)	R
12-02225	Varel	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	225	1			S	+	II(2A)	R
12-02230	Lüdenscheid	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	225	1	1		S	+	II(2A)	R
12-02870	Rostock	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL	225	1			S	+	II(2A)	R
12-03115	Leipzig	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, DAP	225	1	0		S	+	II(2A)	R
12-00046	Frechen	ERY, CLI, FUS, MFL	225	0,25	0,25		S		none	S
16-02658	nicht aufgeführt	PEN, OXA, CIP, MFL, COX, OxaSu	8	0,5	1		S	+	IV(2B)	R
16-02942	nicht aufgeführt	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, COX, OxaSu	8	1	1		S	+	IV(2B)	R
11-03330	Oberhausen	PEN, GEN, ERY, CLI, CIP, MFL	228	1			S		none	S
15-02439	Magdeburg	sensibel	30	0,063	0,25		S		none	S
10-00856	Oldenburg	PEN, OXA, TET, OxaSu	398	0,5	0,5		S	+	V(5C2&5)	R

Isolat	Herkunft (Stadt)	Resistenzprofil ^a	St ^b	MBV ^c CPT MHK (mg/L) 1. Testung	MBV CPT MHK (mg/L) 2. Testung	MBV CPT MHK (mg/L) 3. Testung	MBV CPT MHK Interpretation ^d	<i>mecA</i>	SCCmec ^e	OXA Resistenz
09-00212	Murnau	PEN, OXA, GEN, ERY, CLI, OTE, CIP, SXT i, MFL, OxaSu	239	0,5	1	0,5	S	+	III(3A)	R
09-00215	Murnau	PEN, PHO i, GEN, ERY, CLI, OTE, RAM	239	1	1		S		none	S
14-02150	Münster	PEN, OXA, COX, OxaSu	30	1	0,5		S	+	IV(2B)	R
11-01226	Aschaffenburg	PEN, GEN, ERY, TET, RAM	239	0,25			S		none	S
08-00271	Berlin	sensibel	30	0,125	0,125		S		none	S
12-02028	Berlin	PEN, TET	30	0,063	0,25		S		none	S

hellgrau: DAP-S, dunkelgrau: DAP-R

^aPenicillin, PEN; Oxacillin, OXA; Cefoxitin, COX; Chosphomycin, PHO; Gentamicin, GEN; Linezolid, LZD; Erythromycin, ERY; Clindamycin, CLI; Tetracycline, TET; Tigecyclin, TGC; Vancomycin, VAN; Teicoplanin, TPL; Ciprofloxacin, CIP; Moxifloxacin, MFL; Mupirocin, MUP; Daptomycin, DAP; Fusidinsäure, FUS; Rifampicin, RAM; Sulfamethoxazol / Trimethoprim, SXT

^bMLST klonaler Komplex/klonale Linie nach Ridom SeqSphere+

^cMBV, Mikrobouillonverdünnung

^dMHK Interpretation nach EUCAST (klinische Grenzwerte - Bakterien v 5.0/v 6.0)

^eSCCmec-Typ, vorhergesagt durch den SCCmecFinder (CGE)

Anhang 4 | Verworfen Gensequenzen aus *S. aureus* COL (NC-002951)

Gensequenz	Minimum [Bp]	Maximum [Bp]	Länge [Bp]	Richtung
transposase CDS	2.255.066	2.255.410	345	forward
transposase CDS	2.254.583	2.254.903	321	forward
transposase CDS	2.226.550	2.227.752	1.203	forward
transposase CDS	1.972.991	1.974.310	1.320	forward
transposase CDS	1.932.920	1.934.239	1.320	forward
transposase CDS	1.906.592	1.906.735	144	reverse
transposase CDS	1.906.180	1.906.389	210	reverse
transposase CDS	1.894.859	1.895.344	486	reverse
transposase CDS	1.888.818	1.889.426	609	forward
transposase CDS	1.887.961	1.888.785	825	forward
transposase CDS	1.780.458	1.781.285	828	reverse
transposase CDS	1.779.634	1.780.242	609	reverse
transposase CDS	1.452.885	1.453.277	393	reverse
transposase CDS	1.452.673	1.452.867	195	reverse
transposase CDS	1.436.788	1.436.955	168	forward
transposase CDS	1.214.797	1.214.991	195	reverse
transposase CDS	674.101	675.510	1.410	forward
transposase CDS	467.453	467.725	273	reverse
transposase CDS	298.293	298.697	405	forward
transposase CDS	149.517	150.001	485	forward
transposase CDS	42.958	44.481	1.524	reverse
transposase CDS	36.353	37.027	675	reverse
beta-lactam-resistant peptidoglycan transpeptidase MecA CDS	41.649	39.643	2.007	reverse
azaleucine resistance protein AzlC CDS	15.444	14.749	696	forward
camphor resistance protein CrcB CDS	1.887.406	1.887.053	354	forward
camphor resistance protein CrcB CDS	1.887.056	1.886.691	366	forward
chloramphenicol resistance protein DHA1 CDS	2.519.863	2.518.676	1.188	reverse
lysostaphin resistance protein A CDS	2.392.025	2.390.766	1.260	forward
methicillin resistance protein CDS	2.469.791	2.468.541	1.251	forward
methicillin resistance protein CDS	1.275.365	1.274.121	1.245	forward
quinolone resistance protein NorB CDS	2.509.763	2.508.363	1.401	reverse
quinolone resistance protein NorB CDS	1.513.152	1.511.761	1.392	reverse
quinolone resistance protein NorB CDS	300.114	298.738	1.377	reverse
quinolone resistance protein NorB CDS	97.707	96.319	1.389	forward
tellurite resistance protein TelA CDS	1.452.617	1.451.481	1.137	forward
tetracycline resistance MFS efflux pump CDS	138.340	136.988	1.353	forward
phage tail protein CDS	2.799.596	2.800.093	498	reverse
phage infection protein CDS	2.729.253	2.732.234	2.982	reverse
phage infection protein CDS	2.431.127	2.432.404	1.278	reverse
phage terminase small subunit CDS	2.074.523	2.075.113	591	reverse
phage head morphogenesis protein CDS	1.352.491	1.353.075	585	forward
phage tail tape measure protein CDS	382.423	388.623	6.201	forward
phage head-tail adapter protein CDS	379.162	379.440	279	forward
phage capsid protein CDS	377.930	379.093	1.164	forward

Anhang 5 | Verworfen Gensequenzen aus *S. aureus* ECT-R2 (NC-017343)

Name	Minimum [Bp]	Maximum [Bp]	Länge [Bp]	Richtung
tellurite resistance protein TelA CDS	1.356.895	1.358.031	1137	forward
quinolone resistance protein NorB CDS	1.416.555	1.417.946	1392	reverse
multidrug resistance efflux pump SepA CDS	2.135.191	2.135.664	474	reverse
methicillin resistance protein CDS	2.361.416	2.362.666	1.251	forward
methicillin resistance protein CDS	1.181.534	1.182.778	1.245	forward
lysostaphin resistance protein A CDS	2.285.961	2.287.220	1260	forward
hyperosmolarity resistance protein Ebh CDS	1.384.283	1.416.157	31875	reverse
camphor resistance protein CrcB CDS	1.772.452	1.772.817	366	forward
camphor resistance protein CrcB CDS	1.772.814	1.773.167	354	forward
Bcr/CflA family drug resistance efflux transporter CDS	2.387.946	2.389.157	1212	forward
Bcr/CflA family drug resistance efflux transporter CDS	2.304.843	2.306.051	1209	reverse
azaleucine resistance protein AzIC CDS	14.73	15.425	696	forward
transposase CDS	143.633	145.525	1893	forward
transposase CDS	612.071	613.465	1395	forward
transposase CDS	142.551	143.636	1086	forward
transposase CDS	2.209.282	2.210.000	719	reverse
transposase CDS	1.803.187	1.803.687	501	reverse
transposase CDS	145.532	145.909	378	forward
transposase CDS	1.354.056	1.354.352	297	forward
transposase CDS	402.475	402.747	273	reverse
transposase CDS	1.937.071	1.937.279	209	reverse
ISL3 family transposase CDS	466.177	467.496	1320	reverse
ISL3 family transposase CDS	643.678	644.997	1.320	reverse
ISL3 family transposase CDS	852.140	853.459	1320	forward
ISL3 family transposase CDS	1.097.605	1.098.924	1320	forward
ISL3 family transposase CDS	1.860.138	1.861.457	1320	forward
ISL3 family transposase CDS	2.063.916	2.065.235	1.320	reverse
ISL3 family transposase CDS	2.568.116	2.569.435	1.320	forward
IS21 family transposase CDS	2.210.604	2.211.095	492	reverse
IS21 family transposase CDS	2.129.845	2.130.159	315	forward
IS6 family transposase IS431mec CDS	36.435	37.109	675	reverse
IS6 family transposase IS431mec CDS	41.781	42.455	675	reverse
IS5/IS1182 family transposase CDS	1.785.751	1.787.286	1.536	forward
phage tail tape measure protein CDS	1.948.398	1.952.927	4.530	reverse
phage tail protein CDS	1.946.917	1.948.401	1.485	reverse
phage tail protein CDS	1.953.838	1.954.482	645	reverse
phage portal protein CDS	1.958.102	1.959.289	1188	reverse
phage infection protein CDS	2.631.447	2.634.428	2.982	reverse
phage infection protein CDS	2.335.292	2.336.569	1.278	reverse
phage head-tail adapter protein CDS	1.955.288	1.955.650	363	reverse
phage head-tail adapter protein CDS	1.955.634	1.955.918	285	reverse
phage head morphogenesis protein CDS	1.259.872	1.260.108	237	forward
phage capsid protein CDS	1.956.212	1.957.357	1146	reverse

Anhang 6 | PLINK definierte Ausreißer

Studie	Ausreißer
DAP	15-01202, 13-02338, 13-01132, 13-03767, 15-01873
CPT	10-00856

Anhang 7 | Füllschema von MHK-Testplatten zur Antibiotika-Resistenzüberprüfung bei Staphylokokken [EUCAST angepasst (01.01.2015)]^a

	COX, PEN (1)	OXA ^b (2)	PHO ^c (3)	GEN (4)	LNZ (5)	ERY (6)	CLI (7)	TET (8)	TGC ^d (9)	VAN ^e (10)	TPL ^e (11)	CIP (12)	
COX ↓ (A)	6	4	128	8	16	8	2	8	2	16	16	4	
(B)	4	2	64	4	8	4	1	4	1	8	8	2	
PEN ↓ (C)	1	1	32	2	4	2	0,5	2	0,5	4	4	1	
(D)	0,5	0,5	16	1	2	1	0,25	1	0,25	2	2	0,5	
(E)	0,25	0,25	8	0,5	1	0,5	0,125	0,5	0,125	1	1	0,25	
SXT ^f → (F)	0,125	8	4	2	1	0,5	PHO- WK [+G6P(25)]	1	2	4	256	512	MUP
RAM → (G)	0,063	1	0,5	0,25	0,125	0,063	DAP- WK [+Ca ²⁺ 50]	0,125	0,25	0,5	1	2	MFL
FUS → (H)	0,032	8	4	2	1	0,5	WK	0,25	0,5	1	2	4	DAP ^g

^a Resistenznährmedium: Mueller-Hinton-Bouillon (MHB), Kationen-eingestellt auf 25 mg Ca²⁺ /L (für alle Antibiotika außer DAP, siehe unten)

^b nur OXA: unter Zugabe von 2 % NaCl; MHK-Grenzwerte für OXA bei *S. aureus* bzw. bei *S. lugdunensis* (links) bzw. bei Koagulase-negativen Staphylokokken (rechts)

^c PHO: unter Zugabe von Glucose-6-phosphat (25 mg/L)

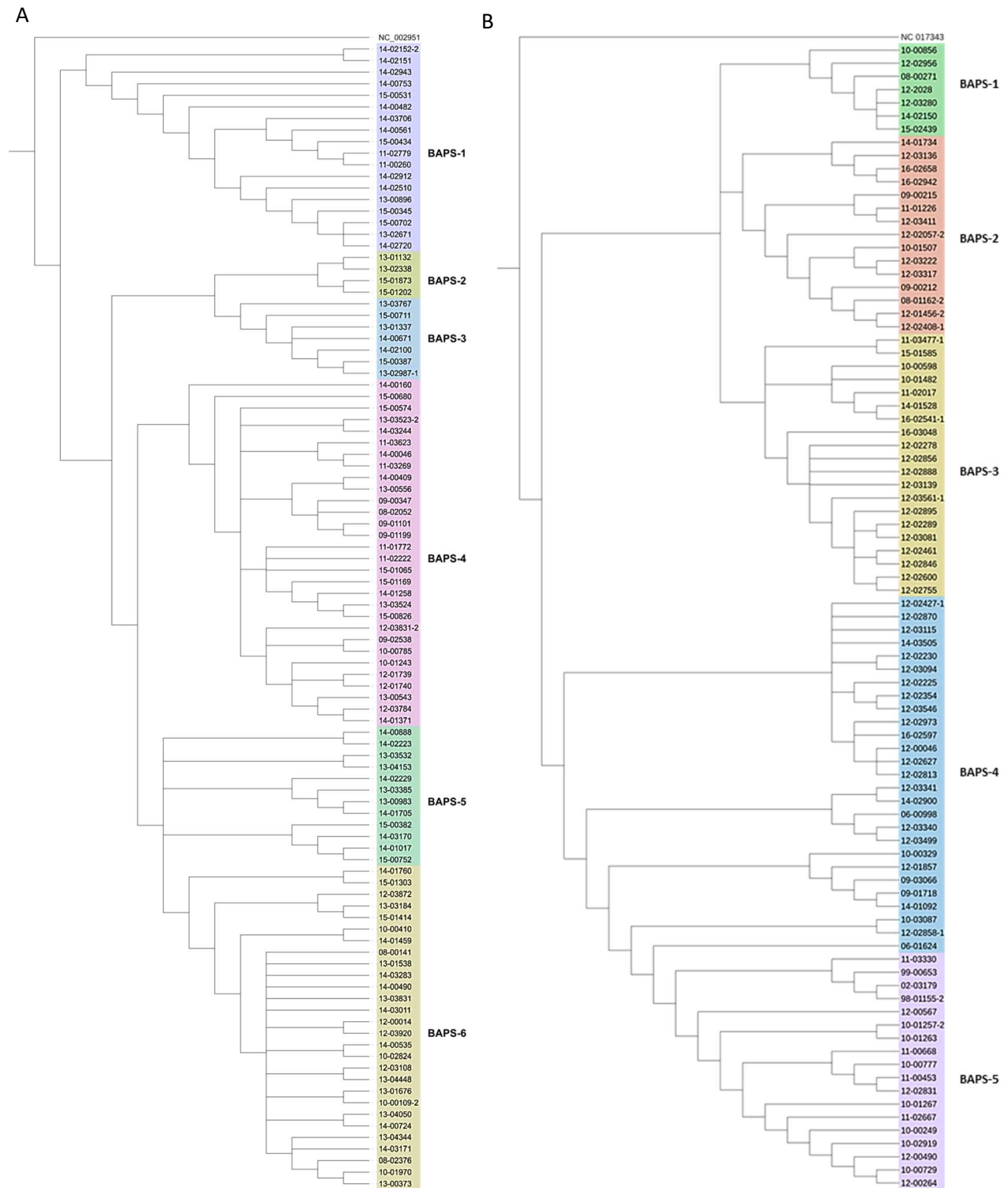
^d TGC: unter Verwendung von max. 15 h alter Kationen-eingestellter MHB (25 mg Ca²⁺/L) und unter Zugabe von 2 % Oxyrase (Oxyrase Inc., Mansfield, OH, USA)

^e VAN, TPL: MHK-Grenzwerte bei *S. aureus* (links in jeweiliger Spalte) bzw. bei Koagulase-negativen Staphylokokken (rechts in der jeweiligen Spalte)

^f SXT: Konzentrationsangabe bezogen auf Trimethoprim-Anteil in der SXT-Kombination (1:20)

^g DAP: in MHB, Kationen eingestellt (50 mg Ca²⁺/L)

Anhang 8 | *hierBAPS* Cluster von *S. aureus* Isolaten der (A) DAP- und (B) CPT-Stammsammlung. Die entsprechenden *hierBAPS* Cluster sind farblich markiert.



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, ohne deren Unterstützung die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Birgit Strommenger, meiner Doktormutter, für die Betreuung dieser Arbeit, den stets ideenreichen Input, die fachliche Unterstützung, die großartigen Möglichkeiten, an internationalen Konferenzen teilzunehmen und die mehrfache Durchsicht dieser Abhandlung.

Danken möchte ich zu gleichen Teilen Herrn Prof. Dr. Guido Werner, der mir die Promotion am Robert Koch Institut ermöglichte und die Rolle des 2. Referenten übernimmt.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinem 1. Referenten, Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn.

Ein außerordentlicher Dank gilt Herrn Dr. Stephan Fuchs für seine umfassende Unterstützung bei allen bioinformatischen Fragestellungen und seine Mühen, auf Probleme schnellstmöglich eine Antwort zu finden. Die vielen zweckdienlichen Diskussionen, aber auch der moralische und persönliche Beistand haben mir stets Mut und Kraft gegeben, mein Promotionsvorhaben erfolgreich abzuschließen. Wegen seines persönlichen und tatkräftigen Einsatzes in allen Hinsichten gilt ihm mein besonders herauszustellender Dank.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Robert Koch Instituts, die mich während meines Promotionsvorhabens begleitet und unterstützt haben.

Ein herzlicher Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Andreas Peschel und Herrn Christoph Slavetinsky, die dankenswerterweise Organismen und Plasmide zur Mutagenese von *S. aureus* zur Verfügung stellten.

Tief verbunden bin ich meiner Mutter, die mich stets mit den richtigen Worten motivierte, mich an schlechten Tagen auffing und in allen Lebenslagen unterstützte. Ihr widme ich diese Arbeit.

Curriculum Vitae



ROBERT WEBER

Biologe (M. Sc.)

PERSÖNLICHE DATEN

Geboren: 11.05.1987 in
Braunschweig
Familienstand: ledig

Gemeindestr. 5
38126 Braunschweig

0152 / 24126834
roberterich1@web.de

SPRACHEN

Englisch: B2 Level



BERUFLICHER WERDEGANG

- 03/2018 – Heute **Robert Koch Institut, Fachgebiet 13**
Fertigstellung der Dissertation im Rahmen eines Hospitationsvertrages
- 03/2015 – 03/2018 **Robert Koch Institut, Fachgebiet 13**
Promotion: Genomweite Assoziationsstudien zur Identifizierung Resistenz-vermittelnder Mutationen in *Staphylococcus aureus* – Chancen und Limitationen eins leistungsfähigen Tools
- 2014 – 2015 **Technische Universität Braunschweig, Institut für Molekular- und Zellbiologie**
Masterarbeit: Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus von Enzymen der Xanthinoxidase-Familie durch die Molybdän-Cofaktor-Sulfurase ABA3 aus *Arabidopsis thaliana*
- 2012 – 2013 **Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, AG Immunregulation**
Bachelorarbeit: Einfluss endogen (epithelial) exprimierter HA auf die Aktivierung Influenza-spezifischer CD8+ T-Zellen in der Lunge



AUSBILDUNG

- 10/2012 – 02/2015 **Technische Universität Braunschweig**
Master of Science in Biologie mit dem Schwerpunkt Zell- und Infektionsbiologie
- 10/2009 – 10/2012 **Technische Universität Braunschweig**
Bachelor of Science in Biologie
- 07/2008 – 03/2009 **Arbeiterwohlfahrt in Braunschweig**
Zivildienst
- 08/2005 – 06/2008 **Otto-Bennemann-Schule in Braunschweig**
Allgemeine Hochschulreife